

Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Marcus Winter
aus Seeheim-Jugenheim

Darmstadt 2007
D 17

Referent: Prof. Dr. G. Kraft
Koreferent: Prof. Dr. P. G. Layer

Tag der Einreichung: 11. Juni 2007
Tag der Disputation: 8. August 2007

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung / Abstract	1
1 Problemstellung	5
2 Einleitung	7
2.1 Physikalische Eigenschaften von Strahlung	7
2.1.1 Strahlenqualität und Dosis	7
2.1.2 Dosisdeposition locker ionisierender Strahlen	7
2.1.3 Dosisdeposition dicht ionisierender Strahlen	8
2.1.4 Tiefendosisprofil locker und dicht ionisierender Strahlen	9
2.1.5 Eigenschaften der verwendeten Strahlenqualitäten	10
2.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung	11
2.2.1 Schädigung der DNA	11
2.2.2 Inhibition der Zellzyklusprogression	12
2.2.3 Induktion von Chromosomenaberrationen	17
2.2.4 Induktion genetischer Instabilität	18
2.3 Hautfibroblasten als Modellsystem	19
2.3.1 Hautfibroblasten <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i>	19
2.3.2 Alterung von Fibroblasten und replikative Seneszenz	20
2.4 Motivation - Risikoabschätzung von Spätkomplikationen	22
2.4.1 Tumorthherapie mit schweren Ionen	22
2.4.2 Bemannte Raumfahrt	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Zellen und Zellkulturmethoden	27
3.1.1 Verwendete Fibroblasten	27
3.1.2 Kultivierungsbedingungen	29
3.2 Charakterisierung der Zellen	31
3.2.1 Bestimmung der Wachstumskinetik	31
3.2.2 Bestimmung des Alters der Zellpopulationen	31
3.2.3 Bestimmung der Zellzyklus-Synchronisierung	32
3.2.4 Bestimmung der Zellkernfläche	32
3.2.5 Test auf Befall mit Mykoplasmen	33
3.3 Bestrahlungsmethoden	33
3.3.1 Bestrahlung mit schweren Ionen	33

3.3.2	Bestrahlung mit Röntgenstrahlen	35
3.4	Analysemethoden	35
3.4.1	Analyse der Zellzykluskinetik	35
3.4.2	Proteindetektion von Zellextrakten	37
3.4.3	Proteindetektion auf Einzelzellebene	39
3.4.4	Bestimmung des Differenzierungsmusters	43
3.4.5	Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Charakterisierung der Fibroblasten	46
4.1.1	Voruntersuchungen für die Bestrahlungsexperimente	46
4.1.2	Langzeitentwicklung unbestrahlter Fibroblasten	49
4.2	Langzeitentwicklung nach Bestrahlung	55
4.2.1	Phase I: Bestrahlte Fibroblasten und ihre Nachkommen	55
4.2.2	Phase II: Intermediäre Entwicklung der Nachkommen	72
4.2.3	Phase III: Spätentwicklung der Nachkommen	77
5	Diskussion	85
5.1	Alterung unbestrahlter Vorhautfibroblasten	85
5.1.1	Kontinuierlicher Rückgang der Proliferation	85
5.1.2	Zunehmende Differenzierung	86
5.1.3	Expression von Inhibitoren der Zellzyklusprogression	89
5.1.4	Schlussfolgerung: Merkmale der zellulären Seneszenz	93
5.2	Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten	94
5.2.1	Phase I: Bestrahlte Fibroblasten und ihre Nachkommen	94
5.2.2	Phase II: Intermediäre Entwicklung der Nachkommen	106
5.2.3	Phase III: Spätentwicklung der Nachkommen	110
5.2.4	Schlussfolgerung: Vorzeitige Alterung nach Bestrahlung	118
5.2.5	Ausblick	122
A	Anhang	123
A.1	Zellkulturmedien und Zusatzstoffe	123
A.2	Chemikalien und Kits	124
A.3	Lösungen und Puffer	126
A.4	Antikörper	129
A.5	Sonstige Materialien	130
	Literaturverzeichnis	133
	Lebenslauf	151
	Erklärung gemäß § 9 der Promotionsordnung	153

Abbildungsverzeichnis

2.1	Verteilung der Energiedeposition von Röntgen- und Ionenstrahlen . . .	8
2.2	Dosisprofil von Röntgenstrahlen und schweren Ionen	9
2.3	Verteilung der Teilchendurchgänge bei den verwendeten Fluenzen . . .	11
2.4	DNA Schäden in Folge ionisierender Strahlung	12
2.5	Zellzyklusphasen und -Kontrollpunkte	13
2.6	Zellzyklusregulation am G ₁ -Kontrollpunkt	15
2.7	Formen von Chromosomenaberrationen	17
2.8	Schematischer Aufbau des Bindegewebes	19
2.9	Prinzip der Bestrahlung eines ausgedehnten Tumervolumens	23
2.10	Hauptbestandteile der kosmischen Strahlung	25
3.1	Ablauf der Experimente	28
3.2	Differenzierungsstadien der AG 1522 Fibroblasten	44
4.1	Synchronität der Fibroblasten bei der Bestrahlung	46
4.2	Verteilung der Zellkernfläche bei der Bestrahlung	47
4.3	Proliferation der Kontrollpopulation	49
4.4	Entwicklung des Zellvolumens in der Kontrollpopulation	50
4.5	β-Galaktosidase-Aktivität in Kontrollzellen	51
4.6	Differenzierung der Kontrollpopulation	52
4.7	Proteinexpression in der Kontrollpopulation	54
4.8	Einfluss des Mediaumaustauschs auf die Proliferation	56
4.9	Anteil BrdU-markierter Zellen nach Bestrahlung	57
4.10	Anteil an Zellen in der G ₀ /G ₁ -Phase nach Bestrahlung	58
4.11	Einfluss der Strahlendosis und -qualität auf die Zellzyklusinhibition . .	59
4.12	Proliferierende Zellen, 5 und 19 Tage nach der Bestrahlung	60
4.13	Entwicklung der Proliferation nach Bestrahlung	61
4.14	Differenzierungsmuster bis 35 Tage nach Bestrahlung	63
4.15	Zellmorphologie unfixierter Zellen, 17 und 31 Tage nach Bestrahlung . .	64
4.16	β-Galaktosidase-Aktivität nach Bestrahlung	65
4.17	<i>Western-Blots</i> und Quantifizierung, 1 bis 35 Tage nach Bestrahlung . .	66
4.18	Zelluläre Akkumulation von p53-Ser15p	67
4.19	Zelluläre p21- und p16-Expression auf Einzelzellebene	68
4.20	Proteinexpression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium	71
4.21	Entwicklung Proliferation, 42 bis 115 Tagen nach Bestrahlung	72

4.22 Differenzierungsmuster zwischen 43 bis 99 Tagen nach Bestrahlung . . .	73
4.23 Zellmorphologie unfixierter Zellen, 70 und 129 Tage nach Bestrahlung .	74
4.24 β -Galaktosidase-Aktivität nach Bestrahlung	75
4.25 <i>Western-Blots</i> und Quantifizierung, 43 bis 130 Tage nach Bestrahlung .	76
4.26 Entwicklung der Proliferation ab 130 Tage nach Bestrahlung	78
4.27 Differenzierungsmuster, 99 bis 219 Tage nach Bestrahlung	79
4.28 Zellmorphologie unfixierter Zellen, 129 Tage nach Bestrahlung	80
4.29 β -Galaktosidase-Aktivität nach Bestrahlung	81
4.30 <i>Western-Blots</i> und Quantifizierung, 130 bis 225 Tage nach Bestrahlung	82
4.31 Zelluläre Akkumulation von p53-Ser15p, 177 Tage nach Bestrahlung . .	83
5.1 Verlust von PMF bei wiederholtem Passagieren (Schema)	87
5.2 Signaltransduktion am G ₀ /G ₁ -Kontrollpunkt (Schema)	90
5.3 POISSON-Verteilung und nicht kritisch getroffene Zellen	96
5.4 Zu erwartender Anteil proliferierender Zellen	97
5.5 Mitoseindex und Aberrationen nach Kohlenstoff-Bestrahlung	98
5.6 Proteinexpression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium	105
5.7 Ausdünnung der ursprünglich bestrahlten Zellen	108
5.8 Anteil apoptotischer Zellen	111
5.9 Morphologie der Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen	112
5.10 Entwicklung der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung	114
5.11 Klonale Aberrationen in den Nachkommen bestrahlter Zellen	115
5.12 Karyotyp der Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen	116
5.13 Entwicklung der relevanten Endpunkte (Schema)	118

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cycline dependent kinase)
CPD	Gesamtzahl an durchlaufenen Teilungen (cumulative population doublings)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FpG	Fluoreszenz plus GIEMSA
GSI	Gesellschaft für Schwerionenforschung
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
LET	linearer Energietransfer
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MF	mitotisch aktive Fibroblasten (Progenitorfibroblasten)
NHEJ	nichthomologe Endverknüpfung (non-homologous end joining)
PBS^{w/o}	phosphatgepufferte Saline, ohne Calcium- und Magnesium-Ionen (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PD	Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen (population doublings)
PE	Koloniebildungsfähigkeit (plating efficiency)
PMF	postmitotische Fibroblasten

RBW	relative Biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SIS	Schwerionensynchrotron
TBST	TRIS-gepufferte Tween-20 Salzlösung (Tris-Buffered Saline Tween-20)
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UNILAC	Linearbeschleuniger (universal linear accelerator)

Zusammenfassung

In der Strahlentherapie werden Tumore mit hohen Dosen bestrahlt, wobei das umgebende gesunde Gewebe bestmöglich geschont werden soll. Das invertierte Dosisprofil von schweren Ionen ermöglicht es, im Gegensatz zur Photonenstrahlung, tief liegende Tumore mit einer hohen Dosis zu bestrahlen und das davor liegende gesunde Gewebe zu schonen. Für die Abschätzung des Risikos von Spätkomplikationen nach der Bestrahlung ist eine genaue Kenntnis der biologischen Wirkung dieser verschiedenen Strahlenqualitäten erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung von Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen auf die vorzeitige Alterung und Langzeitentwicklung humaner Hautfibroblasten untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf den ursprünglich bestrahlten Zellen und deren Nachkommen. Fibroblasten besitzen *in-vitro* nur eine begrenzte Lebensspanne, die mit der replikativen Seneszenz der Zellen endet. Bei bestrahlten Fibroblasten werden Veränderungen beobachtet, die Übereinstimmungen mit der natürlich auftretenden Seneszenz zeigen. Diese strahleninduzierte vorzeitige Alterung der Fibroblasten spielt in der Strahlentherapie eine große Rolle bei der Entstehung von Spätkomplikationen, sie wird als ein Mechanismus zur Erhaltung der Integrität des Genoms angesehen.

Die Untersuchung der strahleninduzierten Alterung wurde an AG 1522 Vorhautfibroblasten durchgeführt, die mit Kohlenstoff-Ionen (9,8 MeV/u) und Röntgenstrahlen (250 kV) in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus bestrahlt worden waren. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen über mehrere Monate bis zur replikativen Seneszenz subkultiviert. In diesem Zeitraum wurde die Inhibition der Zellzyklusprogression mittels BrdU-Markierung und im Durchflusszytometer untersucht. Die vorzeitige Differenzierung und Alterung der Zellen wurde morphologisch und molekularbiologisch analysiert. Dazu wurden das Differenzierungsmuster der Zellen und die Expression bzw. Aktivität von Proteinen der Zellzykluskontrolle und der Seneszenz (p53, p21 (CIP1/WAF1/SDI1), p16 (INK4a), β -Galaktosidase) bestimmt.

Sowohl die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen als auch mit Röntgenstrahlen führte zur dosisabhängigen Inhibition eines Teils der Population, an die sich die vorzeitige Differenzierung und Alterung der Zellen anschloss (Phase I). Kohlenstoff-Ionen haben dabei eine höhere Effektivität als Röntgenstrahlen. In allen bestrahlten Populationen existierte jedoch eine Subpopulation von Zellen, die weiter proliferierten und die schnell den Hauptteil der Population darstellten (Phase II). Das Aufwachsen dieser Subpopulation erfolgte nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen schneller als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Nach mehreren Monaten traten erneut Anzeichen einer vorzeitigen

Differenzierung und Alterung auf, die dauerhaft war und bei einem früheren Zellalter als bei den Kontrollzellen auftrat (Phase III). In einem Fall trat dagegen nach Bestrahlung mit 16 Gy Röntgenstrahlen eine stark veränderte Expression von Proteinen der Zellzykluskontrolle auf, die von einem starken Populationswachstum, klonaler Expansion und genetischer Instabilität begleitet wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bestrahlte Fibroblasten mit DNA-Schäden durch Differenzierung und Seneszenz aus der proliferierenden Population entfernt werden. Auch diejenigen Zellen, die nach der Bestrahlung noch über längere Zeit proliferieren haben eine begrenzte Lebensspanne. Dies gilt sowohl für die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen als auch für die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Bei beiden Strahlenqualitäten war die Zahl an Chromosomenaberrationen nicht größer als in der Kontrolle. Die Zellzyklusinhibition und vorzeitige Alterung ist demnach ein wirksamer Mechanismus zur Bewahrung der Integrität des Genoms. Das langsame Aufwachsen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten und das Auftreten eines stark proliferierenden instabilen Klons nach einer hohen Dosis Röntgenstrahlen deuten jedoch darauf hin, dass die Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten stärker geschädigt sind als die Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen. Diese Hypothese muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes „Genetische Wirkung dicht ionisierender Strahlung“ (Förderkennzeichen: 02 S 8203) durchgeführt. Teilergebnisse aus dieser Dissertation sind in den folgenden Veröffentlichungen enthalten:

- FOURNIER, C.; BECKER, D.; WINTER, M.; BARBERET, P.; HEISS, M.; TOPSCH, J.; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Cell cycle-related bystander responses are not increased with LET following heavy ion irradiation. In: *Radiation Research* 167 (2007), Nr. 2, S. 194–206
- FOURNIER, C. et al.: Interrelation between differentiation, senescence and genetic instability in radiation exposed long-term cultures of fibroblasts. In: *Radiotherapy & Oncology*, akzeptiert.

Abstract

In radiation therapy tumors are treated with high doses, while at the same time the surrounding healthy tissue should be spared to the greatest possible extent. Unlike photon irradiation, the inversed dose depth profile of heavy ions allows irradiation of deeply seated tumors with a high dose and sparing of the preceding healthy tissue. The risk estimation of late complications after radiation therapy requires a precise knowledge of the biological effect of these differing radiation qualities.

Therefore, in the present work the effect of carbon ions and X-rays on the premature aging and long term development of human skin fibroblasts was investigated. The emphasis of the investigation was placed on the originally irradiated cells and their progeny. Fibroblasts possess *in-vitro* only a limited life span, which terminates in the replicative senescence of the cells. In irradiated fibroblasts changes can be observed that show similarities to naturally occurring senescence. Radiation induced premature aging of fibroblasts plays a major role in the development of late complications and is regarded to be a mechanism to conserve genetic integrity.

The investigation of radiation induced aging was conducted on AG 1522 human foreskin fibroblasts that were irradiated with carbon ions (9,8 MeV/u) and X-rays (250 kV) during the G₀/G₁-phase of their cell cycle. After irradiation the cells were subcultured for several months until replicative senescence occurred. During this period the inhibition of cell cycle progression was measured by BrdU-labelling and flow cytometry. Premature differentiation and aging of the cells was analysed on the morphological and molecular level. In this regard, the differentiation pattern of the cells and the expression and activity of proteins involved in cell cycle control and senescence (p53, p21 (CIP1/WAF1/SDI1), p16 (INK4a), β -galactosidase) was measured.

Both irradiation with carbon ions and X-rays lead to a dose dependent inhibition of a part of the population that was followed by a premature differentiation and aging of the cells (phase I). In this regard carbon ions were more effective than X-rays. However, in all irradiated populations a subpopulation of cells continued to proliferate and quickly became the prevailing population (phase II). The growth of this population was more rapid after irradiation with carbon ions than after irradiation with X-rays. After several months signs of premature differentiation and aging appeared again and prevailed, the onset of this development occurred at an earlier cell age than in control cells (phase III). In one case, after irradiation with 16 Gy X-rays, a pronounced change in the expression of proteins of the cell cycle control was observed that was accompanied by strong proliferation, clonal expansion and genomic instability.

The results of the present work show that irradiated fibroblasts, which contain DNA damage, are removed from the proliferating pool by differentiation and senescence. Also those cells that continue to proliferate for an extended time after irradiation possess a limited life span. This is true for irradiation with carbon ions as well as X-rays. After both radiation qualities the frequency of chromosomal aberrations was not higher than in control cells. Thus, radiation induced cell cycle inhibition and premature aging are an effective mechanism to preserve genomic integrity. However, the slow regrowth after irradiation with X-rays and the occurrence of a rapidly proliferating clone after a high dose of X-rays suggests that the progeny of fibroblasts irradiated with X-rays are more heavily damaged than the progeny of fibroblasts irradiated with carbon ions. This hypothesis has to be investigated in further experiments.

The present thesis was conducted within the project „Genetische Wirkung dicht ionisierender Strahlung“ (registering mark: 02 S 8203), funded by the BMBF. Partial results of this thesis are included in the following publications:

- FOURNIER, C.; BECKER, D.; WINTER, M.; BARBERET, P.; HEISS, M.; TOPSCH, J.; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Cell cycle-related bystander responses are not increased with LET following heavy ion irradiation. In: *Radiation Research* 167 (2007), Nr. 2, S. 194–206
- FOURNIER, C. et al.: Interrelation between differentiation, senescence and genetic instability in radiation exposed long-term cultures of fibroblasts. In: *Radiotherapy & Oncology*, accepted.

1 Problemstellung

Der Einsatz der Strahlentherapie hat einen hohen Stellenwert bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Etwa zwei Drittel aller Patienten werden im Laufe ihrer Therapie mit ionisierender Strahlung behandelt. Durch ständige technische Weiterentwicklungen und neue Erkenntnisse aus der Strahlenbiologie, Strahlenphysik und Radioonkologie konnten die Behandlungsergebnisse in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Dies gilt insbesondere für die Tumorthherapie mit Kohlenstoff-Ionen, deren Einsatz an der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt seit 1998 zu sehr guten Heilerfolgen führt. Ionisierende Strahlung kann neben der Zerstörung der Tumorzellen aber auch Strahlenschäden im gesunden Gewebe hervorrufen und dadurch die Entstehung von Sekundärtumoren und anderen Spätkomplikationen, wie z. B. die Fibrose, begünstigen. Diese Gefahr tritt nicht nur im Rahmen der Strahlentherapie auf, sondern besteht auch in anderen Situationen, wie z. B. der Radiagnostik (u. a. Röntgen, CT, Mammographie, PET). Für die Entscheidung, ob der aus der Therapie gezogene Nutzen in einem angemessenen Verhältnis zum eingegangenen Risiko steht, ist deshalb eine genaue Kenntnis der biologischen Wirkung der Strahlung erforderlich.

Es war das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die zur Entstehung von strahleninduzierten Spätkomplikationen führenden Mechanismen bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten miteinander zu vergleichen. Strahleninduzierte Spätkomplikationen treten z. T. erst Jahre nach der Bestrahlung auf. Beim Einsatz neuer Formen der Strahlentherapie, wie der Schwerionen-Therapie, können die Erfahrungen mit herkömmlichen Therapieformen nur indirekt in die Risikoabschätzung einfließen. Die experimentelle Untersuchung der Strahlenwirkung mit Zellkulturen leistet somit einen wichtigen Beitrag, um die für die Entwicklung von Spätkomplikationen verantwortlichen Prozesse kontrolliert, schneller und ohne Bestrahlung von Patienten zu erforschen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente basierten daher auf den folgenden Voraussetzungen:

- Schwere Ionen unterscheiden sich durch ihre physikalischen Eigenschaften und ihre biologische Wirkung deutlich von Photonenstrahlen, beide Strahlenqualitäten werden erfolgreich in der Strahlentherapie eingesetzt. Der experimentelle Vergleich ihrer Wirkung ermöglicht Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen und das Risiko von Spätkomplikationen.
- Hautfibroblasten sind *in-vivo* in vielen Gewebetypen vorhanden und werden von jeder äußerlich auf den Organismus treffenden Strahlung beeinflusst. Sie sind daher ein gutes *in-vitro*-Modellsystem für die strahlenbiologische Forschung.

- Ionisierende Strahlung führt zur Inhibition der Zellzyklusprogression und zur vorzeitigen Alterung von Hautfibroblasten. Den dabei ablaufenden Vorgängen wird eine große Bedeutung bei der Entstehung von Spätkomplikationen beigemessen.

Aus diesem Gründen sollte zunächst die normale Alterung von AG 1522 Fibroblasten bis zur replikativen Seneszenz *in-vitro* charakterisiert und mit den Veränderungen verglichen werden, die diese Zellen nach Bestrahlung durchlaufen. Die dabei zu untersuchenden biologischen Endpunkte waren die Proliferation, das Differenzierungsmuster, die Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase und die Regulation von Proteinen der Zellzykluskontrolle (p53, p21 (CIP1/WAF1/SDI1)/CDKN1A und p16 (INK4a)/CDKN2A). Diese Endpunkte sollten bis zum Ende der replikativen Lebensspanne der Zellen, d.h. über bis zu 7 Monate, verfolgt werden. Um die Reaktion auf verschiedene Strahlenqualitäten vergleichen zu können, sollten zur Bestrahlung Teilchenstrahlen (Kohlenstoff-Ionen, $LET = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$, 0,5 Gy bis 4 Gy) und Photonenstrahlen (Röntgenstrahlen, $LET = 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$, 2 Gy bis 16 Gy) eingesetzt werden.

In Kapitel 2 werden zunächst die physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlen und die Grundlagen ihrer biologische Wirkung vorgestellt und danach das verwendete Modellsystem, humane Hautfibroblasten, näher betrachtet. Die Hauptmotive für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind u.a. die Tumorthherapie mit schweren Ionen und die Strahlenbelastung in der bemannten Raumfahrt. Auf diese Themen wird am Schluss der Einleitung kurz eingegangen.

Die Untersuchungen sollten mit verschiedenen, sich ergänzenden Methoden erfolgen, die im Kapitel 3 genau beschrieben werden. Die Proliferation der Zellen wurde mittels kontinuierlicher BrdU-Markierung, Hoechst-BrdU-Quenching und BrdU-Puls-Markierung verfolgt. Das Differenzierungsmuster wurde mittels morphologischer Färbung und fotografischer Dokumentation der Zellen erfasst. Der Status der Proteine der Zellzykluskontrolle wurde mittels SDS-PAGE/*Western-Blotting* und mit einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Einzelzellanalyse quantifiziert.

Die mit in den Experimenten erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel 4 dokumentiert, wobei zunächst die Entwicklung unbestrahlter AG 1522 Fibroblasten bis zum Ende ihrer Lebensspanne präsentiert und anschließend die in drei Phasen eingeteilte Langzeitentwicklung der bestrahlten Zellen gezeigt wird. In Kapitel 5 werden schließlich die bei der natürlichen und strahleninduzierten Alterung auftretenden Gemeinsamkeiten und Unterschiede diskutiert, mit anderen Arbeiten verglichen und die bezüglich der Problemstellung relevanten Schlussfolgerungen gezogen.

2 Einleitung

2.1 Physikalische Eigenschaften von Strahlung

2.1.1 Strahlenqualität und Dosis

Die Bindung zwischen den Atomen eines Moleküls kommt durch die Wechselwirkung ihrer Valenzelektronen zustande. Der Verlust dieser Elektronen wird als Ionisation bezeichnet und führt zur Zerstörung der chemischen Bindung. Strahlung, die beim Durchdringen von Materie so viel Energie abgibt, dass es dabei zur Ionisation von Atomen kommt, wird als ionisierende Strahlung bezeichnet. Für das Auftreten von Ionisationsereignissen ist dabei die räumliche Verteilung der Energiedeposition in der Zielmaterie von Bedeutung. Strahlen, die lokal im Mittel geringe Energiemengen deponieren, werden als locker ionisierend bezeichnet, während Strahlen, die eine lokal begrenzte hohe Energiemenge deponieren, als dicht ionisierend bezeichnet werden. Locker ionisierend sind Röntgen-, β - und γ -Strahlung, dicht ionisierend sind Neutronen-, Protonen- und Schwerionen-Strahlung. Röntgen- und γ -Strahlung sind elektromagnetische Wellen aus Photonen, während es sich bei β -, Neutronen-, Protonen- und Schwerionen-Strahlung um in Bewegung befindliche Teilchen handelt. Die von Strahlung beim Durchgang durch Materie deponierte Energie wird als Dosis quantifiziert und ist als absorbierte Energie pro Masseinheit definiert. Die absorbierte Dosis wird in Gray gemessen (Abkürzung: Gy, Rossi 1998, ICRU Report 60).

2.1.2 Dosisdeposition locker ionisierender Strahlen

Photonenstrahlen ionisieren die Atome der Zielmaterie über Photoeffekt, Comptoneffekt und bei hohen Energien über Paarbildung. Dabei wird die Energie von den Photonen auf Elektronen der Zielmaterie übertragen, wobei die räumliche Verteilung der Energiedeposition zufällig ist. Die durch die Ionisation erzeugten freien Elektronen bauen ihre Energie durch Interaktion mit anderen Elektronen der Zielmaterie ab, bei hinreichender Energie können sie weitere Ionisationen auslösen. Die mittlere freie Weglänge zwischen diesen sekundären Ionisationsereignissen sinkt mit der Energie der beteiligten Elektronen, was zur einer homogenen Verteilung der Ionisationsereignisse führt (siehe Abbildung 2.1). Durch die Absorption in der Materie nimmt die Energiedeposition von Photonenstrahlung mit der Eindringtiefe exponentiell ab (siehe Abbildung 2.2).

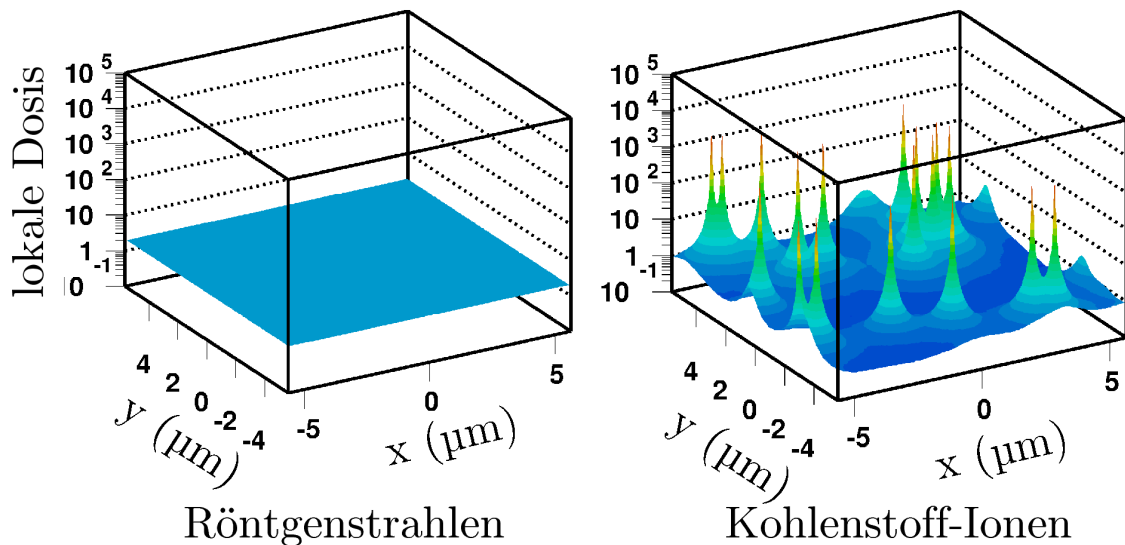


Abbildung 2.1: Röntgenstrahlen deponieren ihre Energie homogen über die bestrahlte Fläche. Schwere Ionen deponieren ihre Energie entlang ihrer Trajektorie (in z-Richtung). Die mittlere Dosis beträgt in beiden Fällen 2 Gy. Der dargestellte Ausschnitt entspricht in seinen Abmessungen der Größe eines typischen Fibroblastenzellkerns. Grafik aus Scholz (2003).

2.1.3 Dosisdeposition dicht ionisierender Strahlen

Bei dicht ionisierenden Teilchenstrahlen findet die Interaktion mit der Zielmaterie auf andere Weise statt als bei locker ionisierenden Photonenstrahlen. Es kommt zwar auch zu Ionisationsereignissen und zur Erzeugung von freien Elektronen, die räumliche Verteilung dieser Elektronen führt jedoch zu einer extrem lokalisierten Energiedeposition entlang der Trajektorie des Ions, der so genannten Teilchenspur (Kraft u. a. 1999). Diese lokalisierte Energiedeposition ist eine Folge davon, dass der überwiegende Anteil an Ionisationsereignissen durch inelastische Kollisionen mit Elektronen der Zielmaterie ausgelöst wird. Die meisten der dabei erzeugten freien Elektronen besitzen eine niedrige Energie und können sich deshalb nicht weit von der Trajektorie entfernen.

Bei der Interaktion zwischen Ion und Materie überträgt das Ion Energie auf die herausgelösten Elektronen. Ionen, die eine hohe Energie besitzen, erzeugen höherenergetische Elektronen als Ionen mit niedriger Energie. Da Elektronen mit hoher Energie eine größere mittlere freie Weglänge besitzen als Elektronen mit niedriger Energie, steigt die Reichweite der freien Elektronen mit der Energie des Ions. Die Energiedeposition nimmt dabei mit dem Quadrat des Abstandes zum Ion ab. Die Folge ist eine extrem hohe lokale Dosisdeposition entlang der Teilchenspur, wobei die Durchgangsorte der Ionen über die bestrahlte Fläche zufällig verteilt sind (Abbildung 2.1).

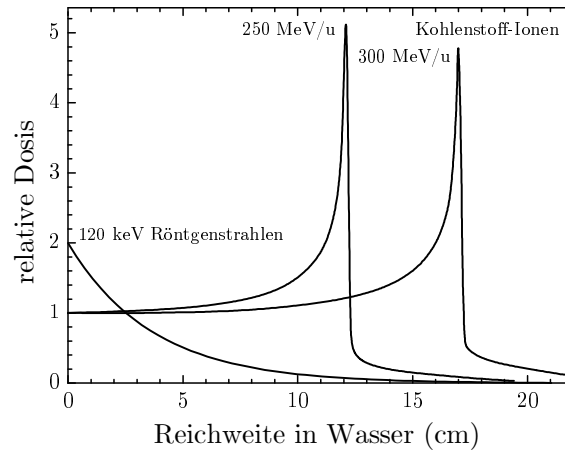


Abbildung 2.2: Energiedeposition von Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen in Abhängigkeit von ihrer Eindringtiefe in Wasser. Für die Ionen ist jeweils ihre Anfangsenergie angegeben. Bei Röntgenstrahlen sinkt die Dosis mit der Eindringtiefe exponentiell. Bei Kohlenstoff-Ionen steigt die Energiedeposition mit der Eindringtiefe an und fällt nach Erreichen der maximalen Eindringtiefe stark ab. Die Reichweite von Kohlenstoff-Ionen steigt mit ihrer Anfangsenergie.

2.1.4 Tiefendosisprofil locker und dicht ionisierender Strahlen

Der Energieverlust eines Ions beim Durchgang durch die Zielmaterie ist im Wesentlichen proportional zum Verhältnis aus dem Quadrat seiner effektiven Ladung und dem Quadrat seiner Energie (Bethe 1930; Bloch 1933, siehe Beziehung 2.1). Der Energieverlust ist demnach bei einer hohen Energie des Ions relativ gering, mit steigender Eindringtiefe verliert das Ion jedoch Energie und der Energieverlust nimmt zu und erreicht ein Maximum kurz vor der maximalen Reichweite des Ions. Beim Erreichen einer sehr niedrigen Energie fängt das Ion Elektronen aus der Zielmaterie ein, was seine effektive Ladung verringert und den Anstieg des Energieverlusts am Ende seiner Reichweite wieder kompensiert. Beide Effekte führen zu dem für Ionen charakteristischen Tiefendosisprofil, bei dem auf eine lange Wegstrecke mit sehr niedriger Energiedeposition eine kurze Strecke mit sehr hoher Energiedeposition folgt (das BRAGG-Maximum) und hinter der die Energiedeposition steil abfällt (Abbildung 2.2).

$$\frac{dE}{dx} \propto \frac{Z_{\text{eff}}^2}{\beta^2} \quad (2.1)$$

$\frac{dE}{dx}$: linearer Energietransfer (LET)
 Z_{eff} : effektive Ladung
 β : v/c ($\hat{=}$ Teilchenenergie)

2.1.5 Eigenschaften der verwendeten Strahlenqualitäten

In dieser Arbeit wurden mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen zwei verschiedene Strahlenqualitäten appliziert, deren für diese Arbeit relevanten Unterschiede hier kurz dargestellt werden. Details zum jeweiligen Bestrahlungsmodus finden sich im Abschnitt 3.3.

Die locker ionisierenden Röntgenstrahlen wurden mit 250 kV beschleunigt, die Energie der Photonen lag daher im Bereich bis 250 keV und ihr linearer Energietransfer (LET) bei ca. 2 keV/ μm . Die für die Deposition der in dieser Arbeit applizierten Dosen benötigte Zahl an Photonen ist so hoch, dass die Verteilung der Energie und der Ionisationsereignisse extrem homogen ist.

Die dicht ionisierenden Kohlenstoff-Ionen hatten beim Auftreffen auf die Zielmaterie eine Energie von 9,8 MeV/u, der LET betrug dabei 170 keV/ μm und der Radius der Teilchenspur etwa 2 μm . Die Reichweite der Ionen in der Zielmaterie betrug bei diesem LET etwa 400 μm . Die Eigenschaften der verwendeten Kohlenstoff-Ionen entsprachen daher den Bedingungen im BRAGG-Maximum, d. h. die niederenergetischen Ionen deponierten auf einer kurzen Länge der Teilchenspur eine lokal begrenzte hohe Dosis. Die Höhe der Dosis wurde über die Anzahl der pro Fläche eingestrahlt Ionen festgelegt und nach Gleichung 3.5 bestimmt, die Fluenzen lagen für die applizierten Dosen von 0,5 Gy bis 4 Gy im Bereich von $1,8 \cdot 10^6$ Teilchen/ cm^2 bis $1,5 \cdot 10^7$ Teilchen/ cm^2 . Die zufällige Verteilung der Teilchendurchgänge führt dazu, dass nicht jeder Zellkern von gleich vielen Teilchen getroffen wird, die pro Zelle deponierte Dosis variiert dementsprechend. Die Anzahl der Treffer hängt neben der Fluenz auch von der Fläche des Ziels ab, bei biologischen Zellen ist dies die Fläche des Zellkerns. Abbildung 2.3 zeigt die bei den verwendeten Fluenzen für Fibroblasten nach der POISSON-Statistik zu erwartende Verteilung der Trefferzahl bzw. Dosis unter der Voraussetzung einer für alle Zellen gleichen Zellkernfläche (berechnet nach Gleichung 2.2). In der Realität unterliegt jedoch auch die Fläche des Zellkerns natürlichen Schwankungen, die daraus resultierenden Konsequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit gesondert berücksichtigt.

$$P_{\lambda}(n) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}, \text{ mit } \lambda = AF \quad (2.2)$$

- P : Wahrscheinlichkeit
- n : Trefferzahl
- A : Fläche des Zellkerns
- F : Teilchenfluenz

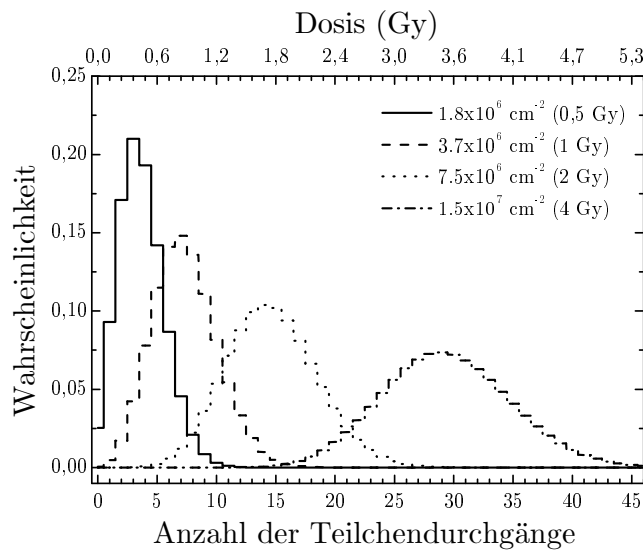


Abbildung 2.3: Nach der POISSON-Statistik zu erwartende Verteilung der Teilchendurchgänge für die in dieser Arbeit verwendeten Fluenzen der 9,8 MeV/u Kohlenstoff-Ionen bei einer durchschnittlichen Zellkernfläche der Fibroblasten von $226 \mu\text{m}^2$. Berechnung nach Gleichung 2.2, die Zellkernfläche wurde wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben bestimmt.

2.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

2.2.1 Schädigung der DNA

Bei Bestrahlung von Organismen können biologische Moleküle direkt durch Ionisation ihrer Bindungselektronen zerstört werden (direkter Effekt). Wenn die Zielmaterie zu einem hohen Anteil aus Wasser besteht, dann kommt es bei ihrer Bestrahlung zur Bildung freier Radikale. Die aus dem Wasser entstandenen Radikale diffundieren und können so biologische Moleküle auf indirektem Weg Schäden verursachen (indirekter Effekt). In biologischen Organismen ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA) das kritische Ziel ionisierender Strahlung (Munro 1970). Durch den direkten und indirekten Effekt kommt es nach Bestrahlung zur Schädigung der DNA. Es werden dabei verschiedene Arten von DNA-Schäden erzeugt, die Abbildung 2.4 zusammengefasst sind. Schäden, die nur einen Strang der DNA betreffen, sind potentiell leicht reparierbar, da in diesem Fall die Information aus dem gegenüberliegenden intakten Einzelstrang ergänzt wird. Dagegen kann bei Schäden, die beide Teile des Doppelstrangs betreffen, Information verloren gehen, weshalb Doppelstrangbrüche als die für das Zellüberleben kritischen Schäden angesehen werden.

Die durch die Ionisation in der DNA erzeugten Schäden sind annähernd proportional zur deponierten Dosis und dabei weitgehend unabhängig von der Strahlenqualität. Per Gray entstehen in einer Zelle etwa 20–40 Doppelstrangbrüche (Übersicht in: Prise u. a. 1998). Wegen der homogenen Verteilung der Dosis über das bestrahlte Volumen gibt

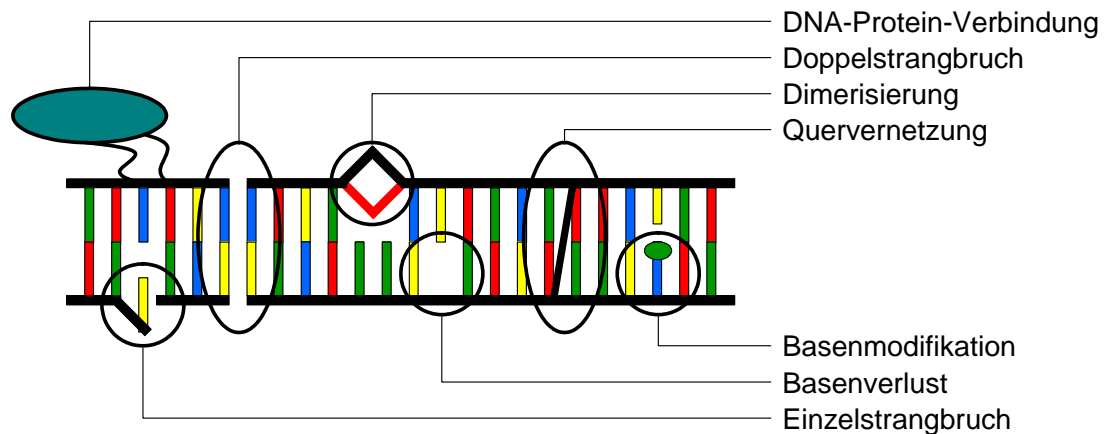


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Arten von Schäden, die an der DNA durch ionisierende Strahlung hervorgerufen werden können. Grafik nach Scholz (2003).

es bei Photonenstrahlung erst bei sehr hohen Dosen eine lokale Häufung von Doppelstrangbrüchen. Im Unterschied dazu deponieren schwere Ionen ihre Dosis konzentriert im Bereich ihrer Flugbahn, wo es vermutlich zur lokalen Häufung von Doppelstrangbrüchen kommt (Übersicht in: Prise u. a. 2001).

Die Zellen höherer Organismen, z. B. Säugetierzellen, sind bis zu einem gewissen Grad in der Lage, Schäden in der DNA zu erkennen und zu reparieren (Übersicht in: Sancar u. a. 2004). Die Effizienz der DNA-Reparatur hängt dabei von der Komplexität des vorliegenden Schadens ab (Pastwa u. a. 2003; Pinto u. a. 2005). Die lokale Häufung der Doppelstrangbrüche nach Ionenbestrahlung führt demnach zu komplexen Schäden, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Reparatur verringert ist, was zu teilreparierter und modifizierter DNA führen kann.

2.2.2 Inhibition der Zellzyklusprogression

Die meisten Zellen eines Organismus sind in der Lage, sich unter den geeigneten Bedingungen zu teilen. Für eine Zellteilung muss das Genom der Zelle verdoppelt und auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Um sicherzustellen, dass dabei möglichst fehlerfreie Kopien des Genoms erstellt werden, unterliegt der Teilungszyklus der Zellen einem strikten Kontrollsystem, mit dem die Zelle auf schadhaft oder abnormal strukturierte DNA auf vielfältige Weise reagieren kann. Die Reaktionsmöglichkeiten der Zelle können dabei von Reparatur der DNA über metabolische Veränderungen bis zum Zelltod reichen (Übersicht in: Lukas u. a. 2004; Lukas und Bartek 2004).

Der Zellzyklus von eukaryotischen Zellen wird von zwei bestimmenden Phasen beherrscht, der Synthesephase (S-Phase), in der die Zelle ihr Genom verdoppelt und der Mitose, in der die DNA zu Chromosomen kondensiert und die Aufteilung des Genoms auf die zwei Tochterzellen erfolgt (Abbildung 2.5). Zwischen diesen Phasen existieren bei den meisten Zellarten zwei Ruhephasen, in der die Zelle wächst und die Synthesepha-

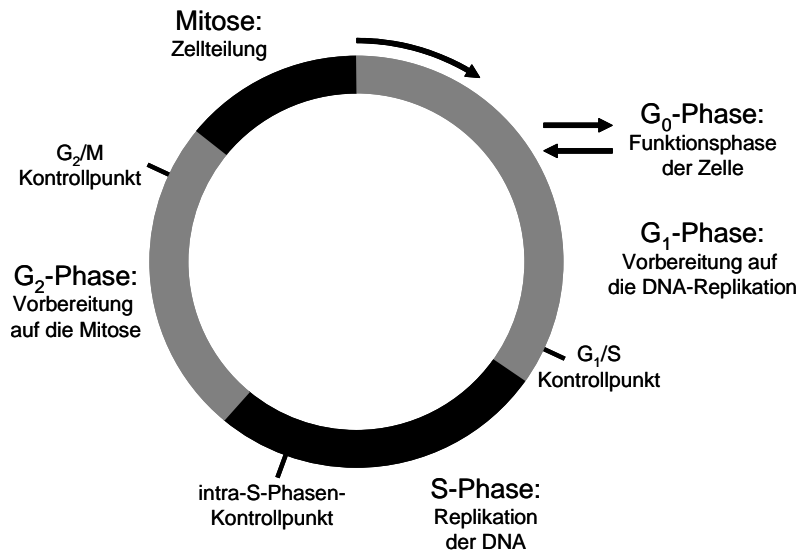


Abbildung 2.5: Abfolge der Zellzyklusphasen bei eukaryotischen Zellen. Auf die G₁-Phase folgt die S-Phase, in der die DNA repliziert wird. Darauf folgt eine Phase, in der sich die Zelle auf die Teilung in der Mitose vorbereitet. Am Ende der G₁ und G₂-Phase und in der S-Phase befinden sich Kontrollpunkte, an denen über den weiteren Durchlauf des Zellzyklus entschieden wird. Zellen, die keine Teilungsaktivität zeigen und funktionellen Charakter haben, werden der G₀-Phase zugeordnet.

se vorbereitet (G₁-Phase) respektive die Teilung der Zelle und Verteilung des Genoms vorbereitet (G₂-Phase) (Übersicht in: Schäfer 1998). G₁, S- und G₂-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. Beim Übergang zwischen den Zellzyklusphasen werden so genannte Kontrollpunkte durchlaufen, an denen geprüft wird, ob die Voraussetzungen für eine weitere Zellzyklusprogression erfüllt sind. Zellen, die keine geeigneten Bedingungen für eine Zellteilung vorfinden, können in einer dauerhaften Ruhephase verharren (G₀-Phase) (Übersicht in: Alberts u. a. 1994). Da G₀- und G₁-Phase bei Fibroblasten hinsichtlich des DNA-Gehalts und des molekularen Status schwer unterscheidbar sind, wird die zwischen Mitose und S-Phase liegende Phase in der vorliegenden Arbeit als G₀/G₁-Phase bezeichnet.

Die Progression durch die einzelnen Phasen des Zellzyklus wird bei eukaryotischen Zellen zum großen Teil durch die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) reguliert. In der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus werden CDK4 und CDK6 durch Bindung mit D-Cyclinen aktiviert (Cyclin-D-CDK4/6), während CDK2 zur Aktivierung Cyclin E benötigt (Cyclin-E-CDK2) (siehe Abbildung 2.6). Die aus der CDK-Cyclin-Bindung resultierenden Komplexe phosphorylieren in mehreren Schritten (zuerst durch Cyclin-D-CDK4/6, dann durch Cyclin-E-CDK2) das Retinoblastom-Protein (Rb), dessen Hauptfunktion die Bindung beziehungsweise Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Gruppe ist (Übersicht in: Sherr und Roberts 1999). Im hypophosphorylierten Zustand bindet Rb den Transkriptionsfaktor E2F, im hyperphosphorylierten Zustand wird E2F freigesetzt und führt zur Transkription verschiedener Gene, deren Produkte zum Eintritt

in die S-Phase und damit zur DNA-Synthese benötigt werden (Übersicht in: Sherr und Roberts 1999).

Damit die Zellzyklusprogression einer Zelle in der G_0/G_1 -Phase inhibiert werden kann, muss die Phosphorylierung von Rb und damit die Freisetzung von E2F verhindert werden, was durch die Unterbindung der Aktivität der CDK erreicht wird (siehe Abbildung 2.6). Das Fehlen von wachstumsstimulierenden Faktoren führt zu einem Mangel an D- und E-Cyclinen, wodurch die CDK keinen aktiven CDK-Cyclin-Komplex bilden können. Eine Inhibition der Zellzyklusprogression unter wachstumsfördernden Bedingungen wird dagegen durch direkte Inaktivierung der CDK durch spezifische Inhibitoren erreicht. Die dazu zur Verfügung stehenden bekannten CDK-Inhibitoren lassen sich auf Grund struktureller und funktioneller Homologien in zwei Gruppen einteilen: Die Inhibitoren aus der CIP/KIP Gruppe, p21 (CIP1/WAF1/SDI1, auch CDKN1A genannt), p27 (KIP1), p57 (KIP2), und die Inhibitoren aus der INK4-Gruppe, p15 (INK4b), p16 (INK4a, auch CDKN2A genannt), p18 (INK4c), p19 (INK4d). Aus beiden Gruppen sind die Inhibitoren p21 (CIP1/WAF1/SDI1) und p16 (INK4a) (im weiteren Verlauf p21 und p16) die am meisten untersuchten (Übersicht in: Pavletich 1999; Vidal und Koff 2000).

2.2.2.1 Induktion der Zellzyklusinhibition

Bei den Kontrollpunkten des Zellzyklus handelt es sich nicht um zeitlich definierte Punkte an denen die Kriterien für eine weitere Zellzyklusprogression geprüft werden, sondern um ständig aktive Systeme mit denen die Reaktion auf schädliche Einflüsse gesteuert wird (Nasmyth 1996). Die Schädigung der DNA führt dabei zum Stopp der Zellzyklusprogression, indem die Aktivität der CDK spezifisch inhibiert wird (Sancar u. a. 2004). Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten und für die Regulation der Zellzyklusinhibition relevanten Faktoren kurz beschrieben.

2.2.2.2 Tumorsuppressorprotein p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 besitzt eine Molekülmasse von 53 kDa und besteht aus 393 Aminosäuren, das p53-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (Übersicht in: Levine u. a. 1991). Die Schädigung der DNA durch Doppelstrangbrüche, wie sie nach ionisierender Strahlung auftreten, setzt eine Kaskade von Proteininteraktionen in Gang, die zur Akkumulation und Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 führt. Dabei kommt es zu posttranslationalen Phosphorylierungs-, Acetylierungs und Sumoylierungsreaktionen an spezifischen Seitenketten des Proteins (Übersicht in: Appella und Anderson 2001). Die Phosphorylierungen treten dabei hauptsächlich an Serin-Seitenketten in der Region des N-Terminus auf, besonders die frühzeitige Phosphorylierung von Serin-15 durch ATM spielt bei der strahleninduzierten Regulation von p53 eine bedeutende Rolle. Nach seiner Aktivierung ist p53 Transkriptionsfaktor verschiedener Zielgene aus unterschiedlichen Funktionsbereichen (Übersicht in: Nakamura 2004). Hinsichtlich der Inhibition der Zellzyklusprogression ist dabei vor allem die In-

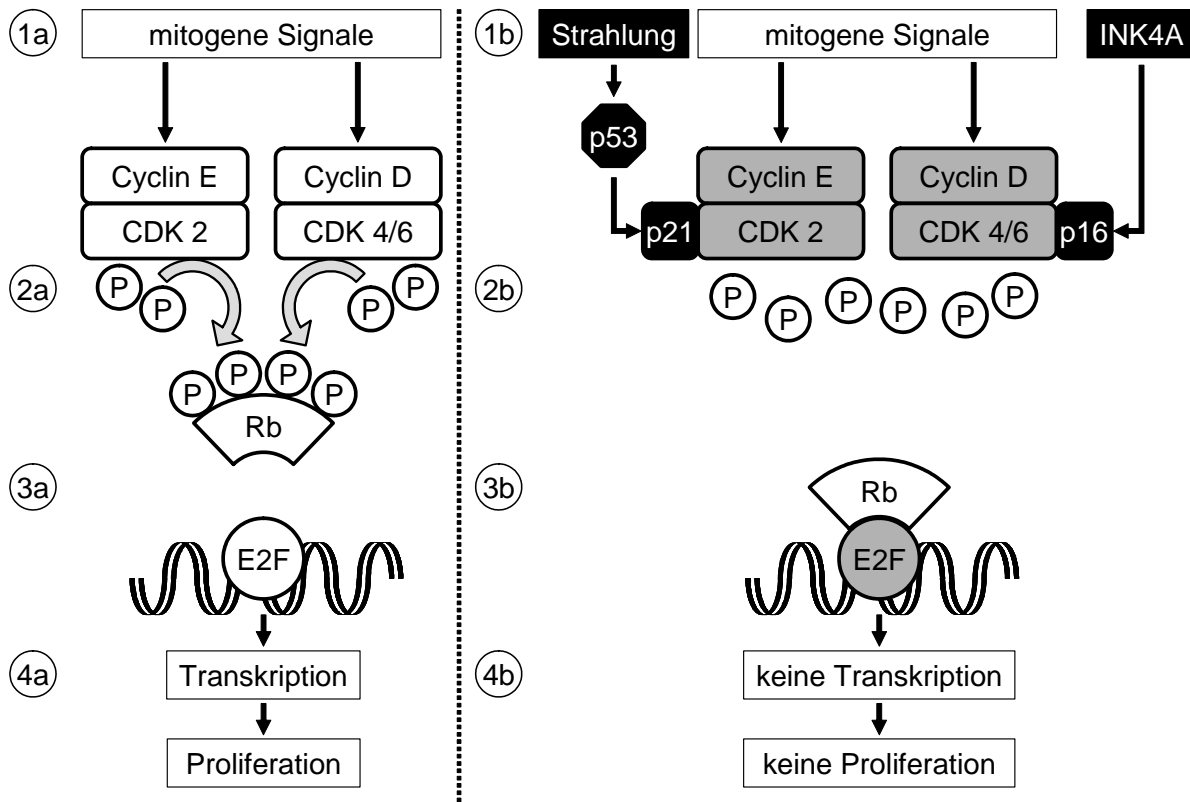


Abbildung 2.6: Schematische und vereinfachte Darstellung der Zellzyklusregulation am G₁-Kontrollpunkt (Nach: Sherr und Roberts 1999). **Links:** 1a: Wachstumsfaktoren führen zur Induktion von Cyclinen, die an die Kinasen CDK2 und CDK4/6 binden und diese aktivieren. 2a: Die Kinasen phosphorylieren das Rb-Protein. 3a: Das phosphorylierte Rb bindet nicht an den Transkriptionsfaktor E2F. 4a: Durch E2F wird die Transkription von Zielgenen der DNA-Replikation aktiviert und die Zelle geht in die S-Phase. **Rechts:** 1b: DNA-Schädigung durch Strahlung führt zur Stabilisierung und Aktivierung von p53. Die transaktivierende Funktion von p53 führt zur Induktion des Kinase-Inhibitors p21. Die Transkription des INK4A-Locus führt zur Induktion des Kinase-Inhibitors p16. 2b: Die CDK-Inhibitoren blockieren die Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe, so dass das Rb-Protein nicht mehr phosphoryliert wird. 3b: Das unphosphorylierte Rb-Protein bindet an den E2F Transkriptionsfaktor und inaktiviert ihn. 4b: Ohne die Aktivität von E2F findet kein Übergang in die S-Phase und damit keine Proliferation statt.

duktion des CDK-Inhibitors p21 relevant. Ein Funktionsverlust von p53 durch Mutation oder Verlust des p53-Gens kompromittiert die Zellzykluskontrolle der Zelle und wird bei vielen Tumoren beobachtet (Übersicht in: Greenblatt u. a. 1994).

2.2.2.3 CDK-Inhibitor p21

Der CDK-Inhibitor p21 besitzt eine Molekülmasse von 21 kDa und besteht aus 164 Aminosäuren, das p21-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (Harper u. a. 1993). Die Transkription von p21 ist komplex reguliert und wird von vielen Faktoren, darunter Sp1/Sp3, Smads, Ap2, STATs, BRCA1, E2Fs aktiviert (Übersicht in: Gartel und Tyner 1999; Gartel und Radhakrishnan 2005), die transkriptionelle Aktivierung des p21 Gens in Folge von DNA-Schädigung erfolgt jedoch hauptsächlich durch p53 (El-Deiry u. a. 1993). Die p53-abhängige Induktion des CDK-Inhibitors p21 in Folge von DNA-Schädigung ist daher ein wichtiger Schritt zur Inhibition der Zellzyklusprogression (Harper u. a. 1993; El-Deiry u. a. 1993). Die Inhibition der Kinaseaktivität von CDK2 wird dabei durch die Bindung von p21 an den Komplex aus Kinase und Cyclin erreicht (Harper u. a. 1993), wobei ein einziges p21 Molekül zur Inaktivierung eines Cyclin E-CDK2 Komplexes ausreicht (Hengst u. a. 1998). Neben seiner inhibitorischen Wirkung auf CDK2 hat p21 jedoch auch einen stimulierenden Einfluss auf die Bildung des CDK4/6-Cyclin-D Komplexes (LaBaer u. a. 1997), indem es den nuklearen Export von Cyclin D1 verhindert (Alt u. a. 2002). Die Mutation von p21 kommt in humanen Tumoren sehr selten vor (Shiohara u. a. 1994; McKenzie u. a. 1997; Patino-Garcia u. a. 1998). Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Antwort auf DNA-Schäden wird p21 auch im Zusammenhang mit der terminalen Differenzierung, der replikativen Seneszenz und dem Schutz vor p53-abhängiger und -unabhängiger Apoptose diskutiert (Übersicht in: Gartel und Tyner 1999; Gartel und Radhakrishnan 2005).

2.2.2.4 CDK-Inhibitor p16

Der CDK-Inhibitor p16 besitzt eine Molekülmasse von 16 kDa und besteht aus 156 Aminosäuren, sein Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (Serrano u. a. 1993). Auf Grund zweier alternativer Leserahmen ist der CDK-Inhibitor nur eines von zwei möglichen Genprodukten, das andere Genprodukt, p14^{ARF} inhibiert MDM2, einem negativen Regulator von p53 (Quelle u. a. 1995; Pomerantz u. a. 1998). Eine Induktion von p16 wird als Reaktion auf übersteigerte Wachstumssignale, wie sie durch die Überexpression von RAS und MAP Kinasen und Myc ausgelöst werden (Serrano 1997; Lin u. a. 1998; Zhu u. a. 1998; Drayton u. a. 2003), in Folge suboptimaler Zellkulturbedingungen (Ramirez u. a. 2001), beim Auftreten von zellulärer Seneszenz (Alcorta u. a. 1996; Hara u. a. 1996; Palmero u. a. 1997), nach DNA-Schädigung durch Chemikalien (Robles und Adami 1998), Telomer-Dysfunktion (Takai u. a. 2003) und nach locker ionisierender Strahlung (Suzuki u. a. 2001) beobachtet. Während über die Mechanismen der inhibierenden Funktion von p16 viel bekannt ist, sind die Signalwege, die zur Induktion führen, zur Zeit noch

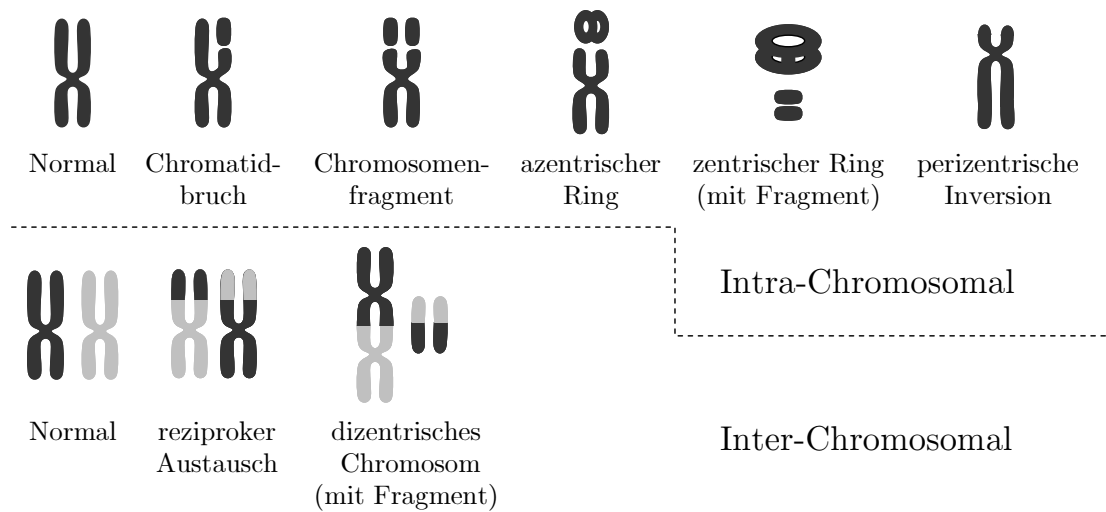


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung möglicher Formen von Chromosomenaberrationen. (Abbildung nach: Evans 1974).

nicht gut verstanden (Übersicht in: Kim und Sharpless 2006). Die Inhibition der Kinaseaktivität von CDK4 und CDK6 durch p16 kann sowohl unter Ausbildung eines Dimers durch Bindung an die Kinase alleine (unter gleichzeitiger Verhinderung der Bindung der D-Cycline) als auch durch Bildung eines Trimers durch Bindung an den Kinase-Cyclin-Komplex erreicht werden, wobei die Dimer-Form *in-vivo* häufiger vorhanden ist (Jeffrey u. a. 2000). Der Verlust der für p16 kodierenden Region zählt zu den häufigsten zytogenetischen Veränderungen bei menschlichen Tumoren (Übersicht in: Kim und Sharpless 2006).

2.2.3 Induktion von Chromosomenaberrationen

Die Schädigung der DNA in Folge von ionisierender Strahlung führt zum Auftreten von Aberrationen, d. h. Veränderungen der Chromosomenstruktur oder -anzahl (Übersicht in: Bender u. a. 1974; Natarajan u. a. 1996). Als Auslöser für die Entstehung von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen wird der Bruch des DNA-Doppelstrangs (DSB) angesehen (Übersicht in: Bryant 2004). Dabei können verschiedene Typen von Aberrationen auftreten, die sich grob in Brüche und Austausche unterteilen lassen (Abbildung 2.7, Übersicht in: Obe u. a. 2002). Brüche treten auf, wenn der Teil eines Chromosoms durch einen DSB abgetrennt und dieser Bruch nicht repariert wird. Die Folge ist, dass das abgebrochene Chromosomenstück bei der nächsten Zellteilung nicht auf die Tochterzellen verteilt werden kann, da es ohne Centromer nicht an die mitotische Spindel binden kann. Austausche entstehen aus dem Zusammenspiel von mehreren Chromosomenbrüchen. Treten mehrere DSB oder andere Schäden nicht weit voneinander entfernt auf, kann es durch fehlerhafte Reparatur zu Entstehung von Translokationen, dizentrischen Chromosomen oder anderen strukturellen Aberrationen kommen. Bei Translokationen

werden Teile eines Chromosoms in ein anderes integriert und die Chromosomen besitzen danach jeweils ein Centromer, wodurch ihre Verteilung auf die Tochterzellen während der Mitose gewährleistet ist. Dizentrische Chromosomen entstehen aus der Verknüpfung zweier Chromosomenenden, das dabei entstehende Chromosom besitzt zwei Centromere. Während der Mitose kann ein dizentrisches Chromosom entlang der mitotischen Spindel in zwei unterschiedliche Richtungen gezogen werden, wodurch neue Brüche und Austausche entstehen können (McClintock 1941). Eine asymmetrische Aufteilung der Chromosomen während der Metaphase kann sogar zur Veränderung der Chromosomenzahl führen. (Übersicht in: Obe u. a. 2002). Die durch chromosomale Aberrationen entstehende Aneuploidie trägt wahrscheinlich zur Tumorgenese bei und ist die häufigste Gemeinsamkeit bei menschlichen Tumoren (Übersicht in: Lengauer u. a. 1998; Sen 2000). Ob Aneuploidie bei der Tumorgenese Ursache oder mitwirkender Faktor ist, wird derzeit noch diskutiert (Übersicht in: Duesberg u. a. 2005; Kops u. a. 2005; Coleman und Tsongalis 2006).

2.2.4 Induktion genetischer Instabilität

Die genetische Instabilität ist durch über die Zeit zunehmende Veränderungen des Genoms charakterisiert (Übersicht in: Morgan u. a. 1996). Ionisierende Strahlung verursacht *in-vitro* und wahrscheinlich auch *in-vivo* (Kadhim und Wright 1998) genetische Instabilität, diese tritt noch mehrere Generationen nach der Bestrahlung in den Nachkommen der überlebenden Zellen auf und manifestiert sich durch chromosomale Aberrationen. Als Ursachen für die genetische Instabilität werden die fehlerhafte Reparatur der durch Strahlung erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche, sekundäre DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Telomerdysfunktion und epigenetische Mechanismen diskutiert (Übersicht in: Suzuki u. a. 2003; Kim u. a. 2006; Rodier u. a. 2005; Mothersill und Seymour 2003). Nach Bestrahlung können an den Bruchstellen Deletionen, Insertionen, Translokationen oder ein Verlust der Heterozygotizität auftreten (Liang u. a. 1998; Richardson und Jasin 2000; Moynahan und Jasin 1997; Pipiras u. a. 1998), die den initialen DNA-Doppelstrangbruch in eine aberrante Chromatinstruktur konvertieren. Die Mechanismen, die zum verzögerten Auftreten der chromosomalen Aberrationen führen, sind nicht geklärt. Vorstellbar ist jedoch, dass falsch reparierte Schäden im Genom der betroffenen Zellen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Deregulation von Zellsystemen führen: Ein später spontan auftretender zusätzlicher genetischer Schaden könnte so Mechanismen ausschalten, die normalerweise die Akkumulation von chromosomalen Aberrationen verhindern. Denkbar wäre hier z. B. die Deaktivierung von Systemen der DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrolle.

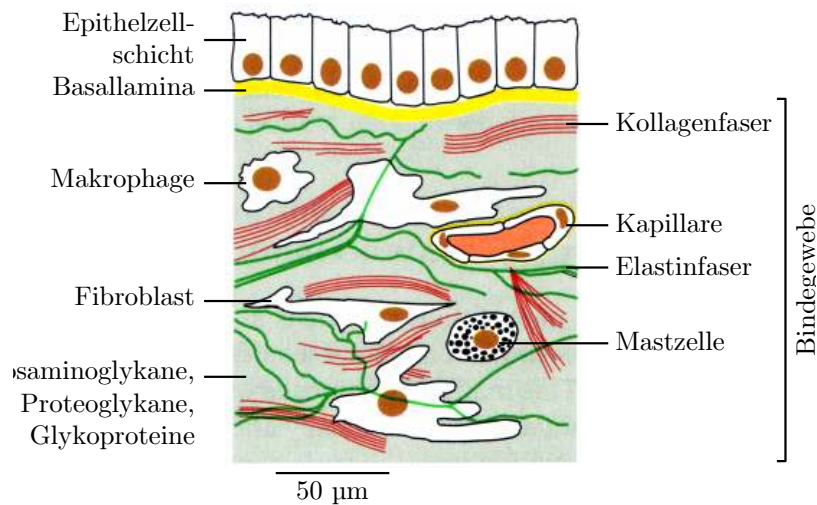


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau des Bindegewebes. Das unter den Epithelzellen liegende Bindegewebe besteht hauptsächlich aus der extrazellulären Matrix, die von den Fibroblasten sekretiert wird (Abbildung nach: Alberts u. a. 1994).

2.3 Hautfibroblasten als Modellsystem

2.3.1 Hautfibroblasten *in-vivo* und *in-vitro*

Wenn höhere Organismen einer Strahlung ausgesetzt werden, sind Fibroblasten immer mit betroffen. Fibroblasten kommen im Bindegewebe vor, wo sie einzeln verteilt in der Grundsubstanz, der extrazellulären Matrix (ECM), liegen. Bindegewebe findet sich intramural, im Interstitium, in Muskeln und Sehnen, unter dem Epithel der Schleimhäute, um Nerven und Gefäßbahnen und vor allem in der Haut, wo es am Aufbau der unterhalb der Epidermis liegenden Dermis und Subkutis beteiligt ist. Das Bindegewebe hat neben mechanischen Aufgaben auch Funktionen in der Regulation des Wasserhaushalts, Stoffaustauschs und dem Schutz vor schädlichen äußeren Einflüssen. Die im Bindegewebe liegenden Fibroblasten sind an der Bildung der ECM beteiligt, sie synthetisieren dabei Vorstufen von Kollagen und andere Matrixkomponenten und die Enzyme für deren Abbau. Durch die Orientierung ihres Zytoskeletts bestimmen sie die Lage der Matrixkomponenten (Übersicht in: Alberts u. a. 1994).

Fibroblasten sind maßgeblich an der Wundheilung beteiligt, sie wandern im Anschluss an die Entzündungsphase aus dem gesunden Gewebe in den Wundbereich ein und regenerieren die ECM. Eine unkontrollierte Wundheilung unter Beteiligung der Fibroblasten führt zum Funktionsverlust des betreffenden Gewebes, die in ihrer klinischen Manifestation als Fibrose bezeichnet wird. Im Unterschied zur kontrollierten Wundheilung kommt es bei der Fibrose zur dauerhaften Schädigung des Gewebes, zur exzessiven Synthese und Deposition von Kollagen und anderen ECM-Proteinen und zur unzureichenden Synthese von abbauenden Enzymen, wodurch der Wundverschluss gehemmt wird. (Übersicht

in: Desmouliere und Tuchweber 1999). Eine verminderte Fähigkeit zur Wundheilung wird auch bei alternden Organismen beobachtet, dabei spielt die bei der Alterung von Fibroblasten auftretende Beeinträchtigung der Beweglichkeit und Proliferation und die damit verknüpfte verstärkte Degradation der ECM eine Rolle (Übersicht in: Ashcroft u. a. 2002).

Wegen ihrer großen Bedeutung im Organismus sind Fibroblasten ein interessanter und häufig untersuchter Zelltyp. Für ihre Untersuchung werden meistens Zellkulturen aus Hautfibroblasten verwendet, in der strahlenbiologischen Forschung sind diese ein weit verbreitetes Modellsystem. Zur Kultivierung werden Hautfibroblasten aus Biopsien gewonnen (Goetz 1975). Fibroblasten heften sich in der Zellkultur an ihre Wachstumsunterlage und bilden im Unterschied zur *in-vivo*-Situation Zellverbände. Unter günstigen Bedingungen teilen sie sich so lange, bis sie keine Wachstumsfläche mehr zur Verfügung haben. Sie stellen ihre Teilungsaktivität nach dem Erreichen dieser so genannten Kontakthemmung ein, können aber nach Auflösen der Kontakthemmung weiter proliferieren.

Bei fortgesetzter Kultivierung von Hautfibroblasten lässt sich eine Entwicklung beobachten, die zu Veränderungen auf morphologischer und biochemischer Ebene und einem Verlust der Teilungsfähigkeit führt (Hayflick und Moorhead 1961; Ben-Porath und Weinberg 2005). Diese Veränderungen werden mit der fortschreitenden Differenzierung der Fibroblasten erklärt. Die Fibroblasten können dabei in sechs verschiedene morphologisch unterscheidbare Differenzierungsstadien klassifiziert werden, welche die Zellen nacheinander durchlaufen (Bayreuther u. a. 1988). Die ersten drei Stadien umfassen die mitotisch aktiven Fibroblasten (MF I, II, III), die auch als Progenitorfibroblasten bezeichnet werden. Die letzten drei Stadien umfassen postmitotische Fibroblasten (PMF IV, V, VI), die ihre Fähigkeit zur Proliferation verloren haben und zu Funktionszellen differenziert sind (Abbildung 3.2, Seite 44). Der Übergang von einem Stadium zum nächsten ist in seinem zeitlichen Verlauf von der Zell-Linie und den Kultivierungsbedingungen abhängig. Beim Durchlaufen der postmitotischen Stadien zeigen die Fibroblasten eine steigende Rate der Kollagensynthese, die im terminal differenzierten Stadium (PMF VI) am größten ist (Rodemann 1993).

Nach Bestrahlung wurde beobachtet, dass Fibroblasten die Differenzierungsstadien schneller durchlaufen und früher das Stadium der terminalen Differenzierung erreichen als unbestrahlten Kontrollzellen (Rodemann u. a. 1991; Herskind und Rodemann 2000; Fournier u. a. 2001). Die strahleninduzierte Differenzierung wird daher auch als der wichtigste Faktor für die Entstehung der Fibrose *in-vivo* angesehen (Rodemann und Bamberg 1995).

2.3.2 Alterung von Fibroblasten und replikative Seneszenz

Alle menschlichen somatischen Zellen haben eine begrenzte Lebensspanne, mit Ausnahme einiger weniger Zelltypen wie z.B. Stamm- und Keimzellen (Troen 2003). Die der Begrenzung des replikativen Potentials zugrunde liegenden Mechanismen sind besonders für das Verständnis der Abläufe bei der Alterung und Tumorentstehung von Bedeutung,

da bei der Alterung die Teilungsaktivität der Zellen zurück geht, wogegen bei der Tumorentstehung die Kontrolle über die Teilungsaktivität verloren geht.

Die kontrollierte Begrenzung der Teilungsaktivität von Zellen wird zur Zeit als ein Mechanismus diskutiert, der Organismen vor der Akkumulation von Zellen schützt, die einen kritischen Grad an potentiell transformierenden Mutationen erreicht haben. Diesen Mechanismus senkt demnach das Risiko einer Entstehung von Krankheiten, die auf einer erhöhten Proliferation basieren, wie z.B. Krebs, (Campisi 2001). Im Gegensatz dazu führt die Mutation und damit der Funktionsausfall verschiedener Gene, die an der Kontrolle der Teilungsaktivität beteiligt sind (Proto-Onkogene, z.B. Rb und Tumorsuppressoren, z.B. p53), zu einer verlängerten Lebensspanne, die als Vorstufe zur Krebsentstehung angesehen wird (Wei u. a. 2003). Demgegenüber führt die Aktivierung einige dieser Gene (z.B. p14^{ARF}, Raf) bei jungen humanen Zellen zu einem Stillstand der Zellproliferation und zur Ausbildung eines Phänotyps, der bei alternden Zellen beobachtet wird (Stanchina u. a. 1998; Zhu u. a. 1998).

Die meisten normalen Zelltypen lassen sich in der Zellkultur nicht unbegrenzt vermehren, es kommt bei dauerhafter Kultivierung zu einem Stillstand der Proliferation, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Übersicht in: Ben-Porath und Weinberg 2005). Der replikativen Seneszenz wird die stress-induzierte vorzeitige Seneszenz gegenübergestellt, die als Folge von DNA-Schädigung, Schädigung der Chromatinstruktur, oxidativem Stress und Überexpression aktivierter Proto-Onkogene (speziell Ras und seine untergeordneten Gene) vorzeitig auftritt (Übersicht in: Toussaint u. a. 2000; Serrano und Blasco 2001; Lloyd 2002). Ob replikative und stress-induzierte Seneszenz auf zwei unabhängige zelluläre Mechanismen zurück gehen oder einen durch unterschiedliche Signale ausgelösten gemeinsamen Mechanismus widerspiegeln, wird diskutiert (Wright und Shay 2002; Ben-Porath und Weinberg 2004).

Die replikative Seneszenz wird als zell-intrinsischer Mechanismus zur Verhinderung einer unbegrenzten Proliferation betrachtet (Hayflick und Moorhead 1961). Als wichtiger Faktor für das Auftreten der replikativen Seneszenz wurde zuerst die Verkürzung der Telomersequenzen während der Replikation angesehen (Harley u. a. 1990): Bei der DNA-Replikation werden beide Stränge der DNA durch die Polymerase sequentiell verdoppelt. Die Polymerase kann die DNA-Replikation nur an einem Ribonukleinsäure-Primer (RNA-Primer) beginnen, der zu diesem Zweck auf dem offenen DNA-Einzelstrang synthetisiert wird. Da die RNA-Primer an den Enden der neu synthetisierten DNA-Stränge nicht abschließend durch DNA ersetzt werden können, ist die Replikation in diesem Bereich nicht vollständig (Übersicht in: Watson 1972; Olovnikov 1973). Dieser als End-Replikationsproblem bezeichnete Prozess führt zur Verkürzung der Chromosomen bei jeder Replikation, bei Fibroblasten liegt der Verlust an DNA bei etwa 50 Basenpaaren pro Zellteilung (Huffman u. a. 2000). Da jedoch die am Ende der Chromosomen liegende DNA aus repetitiven und nicht-codierenden Sequenzen besteht, wird ein Verlust von DNA aus codierenden Genregionen verhindert (Übersicht in: Neidle und Parkinson 2003). Mit steigender Zahl an durchlaufenen Zellteilungen werden die Telomersequenzen jedoch stetig kürzer. Die Verkürzung der Telomere auf einen kritischen Wert wird als

ein Mechanismus diskutiert, der die replikative Seneszenz auslöst (Übersicht in: Campisi 1997). Eine Regeneration der Telomer-DNA ist durch die Aktivität der Telomerase prinzipiell möglich, wird jedoch außer bei Zellen der Keimbahn nur bei wenigen somatischen Zellen beobachtet (Übersicht in: Greider 1994). Im Unterschied dazu wird Telomerase-Aktivität bei nahezu 90 % aller menschlichen primären Tumoren festgestellt und scheint ein wesentlicher Faktor für die Immortalisierung zu sein (Übersicht in: Greider 1998).

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass nicht alleine die Länge der Telomer-DNA, sondern vielmehr Störungen im Gesamtzustand der Telomerstruktur (Telomer-Dysfunktion) für das Auftreten der Seneszenz verantwortlich sind (Übersicht in: Rodier u. a. 2005; Gilley u. a. 2005; Herbig und Sedivy 2006). Eine derartige Telomer-Dysfunktion führt zur Aktivierung der gleichen Signalwege, die auch bei Antwort auf DNA-Schäden beteiligt sind und zur Stillstand der Proliferation führen (Übersicht in: Di Fagagna u. a. 2004). Die selben Signalwege sind auch bei der Reaktion auf externe Einflüsse wie ionisierende Strahlung oder oxidativen Stress beteiligt und sind möglicherweise eine Erklärung für die Übereinstimmungen, die zwischen der natürlich und vorzeitig auftretenden replikativen Seneszenz bestehen (Reaper u. a. 2004).

Die Relevanz der replikativen Seneszenz für die Situation *in-vivo* ist in der Diskussion (Übersicht in: Rubin 2002; Von Zglinicki 2003). Seneszente Zellen könnten *in-vivo* zur Alterung von Organismen beitragen (Übersicht in: Campisi 2005). In Geweben mit relativ konstanter Zellzahl kann die Akkumulation von nicht-proliferierenden Zellen die Reparatur und Erneuerung beeinträchtigen. Seneszente Fibroblasten sekretieren große Mengen verschiedener Matrix-Metalloproteinasen, epitheliale Wachstumsfaktoren und entzündungsfördernde Cytokine (Krtolica und Campisi 2002). Dadurch könnten seneszente Zellen zur Alterung und altersbedingten Pathologie beitragen, indem sie Gewebeveränderungen und lokale Entzündungen stimulieren, welche die Gewebestruktur und -funktion kompromittieren (Parrinello u. a. 2005). Daneben könnten auch Zellen, die prä-neoplastische Mutationen enthalten durch seneszente Zellen zur Proliferation stimuliert werden (Krtolica u. a. 2001; Roninson 2002; Dilley u. a. 2003).

2.4 Motivation - Risikoabschätzung von Spätkomplikationen

2.4.1 Tumorthherapie mit schweren Ionen

Kohlenstoff-Ionen besitzen mehrere Eigenschaften, die ihren Einsatz bei der strahlentherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen nahelegen und eine sehr präzise, kontrollierte und gezielte Deposition der Strahlendosis im Tumorgewebe ermöglichen (Übersicht in: Weyrather und Debus 2003, siehe auch Abschnitt 2.1.3): Kohlenstoff-Ionen besitzen eine 22 000-fach größere Masse als Elektronen und werden deshalb beim Abbremsprozess kaum seitlich gestreut. Beim Durchdringen von Materie deponieren sie daher ihre Energie im geringen Abstand um ihre Trajektorie, was bei in der Strahlenthe-

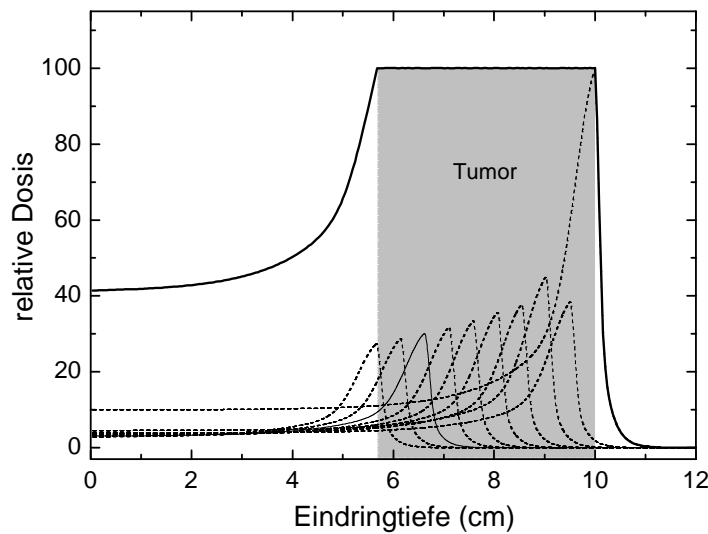


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Bestrahlung eines ausgedehnten Volumens bei der Tumorthherapie mit schweren Ionen. Durch Überlagerung von schweren Ionen verschiedener Primärenergie und damit verschiedener Reichweite wird eine homogene Dosisdeposition im Zielbereich erreicht. Die Breite der einzelnen BRAGG-Maxima wurde zur besseren Darstellung deutlich größer als die tatsächlich beobachteten Breiten gewählt. Grafik nach Scholz (2003)

rapie eine scharfe Abgrenzung zwischen Tumor und gesundem Gewebe ermöglicht. Die Reichweite der Kohlenstoff-Ionen hängt dabei von ihrer Energie ab, daher kann durch geeignete Wahl ihrer Anfangsenergie der Endpunkt der Ionen gezielt in das Tumorgewebe gelegt werden, wobei die Streuung in longitudinaler Richtung ebenfalls gering ist. Da schwere Ionen den größten Teil der Dosis am Ende ihrer Reichweite im BRAGG-Maximum deponieren, erhält das Tumorgewebe daher eine sehr hohe Dosis, während das gesunde Gewebe vor und hinter dem BRAGG-Maximum nur sehr wenig belastet wird. Kohlenstoff-Ionen zeigen daneben beim Durchdringen von Materie eine geringere seitliche Streuung als Photonen oder leichtere Ionen, was die präzise Bestrahlung des Tumorumfanges begünstigt.

Neben diesen physikalischen Eigenschaften, die eine gezielte Bestrahlung des Tumorumfanges bei bestmöglicher Schonung des gesunden Gewebes ermöglichen, haben Kohlenstoff-Ionen am Ende ihrer Reichweite auch eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW) als am Anfang (Übersicht in: Raju u. a. 1978a, b, c; Raju und Carpenter 1978). Dieses günstige RBW-Verhältnis zwischen Eingangs- und Zielbereich führt zu einer Reduktion der für das Zerstören des Tumorgewebes nötigen Dosis, was eine größere Schonung des gesunden Gewebes im Eingangsbereich erlaubt (Übersicht in: Kraft 1990).

Mit dem Ziel, die oben genannten Vorteile von Ionenstrahlen in optimaler Form in die klinische Praxis umzusetzen, wurde an der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt in Kooperation mit der Radiologischen Klinik Heidelberg, dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg und dem Forschungszentrum Rossendorf ein Pilot-

projekt zur Tumorthherapie mit Kohlenstoffstrahlen realisiert (Übersicht in: Eickhoff u. a. 1999). In der dafür aufgebauten Bestrahlungsanlage wurden mehrere Verbesserungen implementiert, die sie von ähnlichen Anlagen unterscheiden:

- Die optimale Anpassung der Dosisdeposition an das Tumervolumen durch ein vollständig aktives Strahlführungsverfahren (Chu u. a. 1993; Haberer u. a. 1993).
- Die Möglichkeit der Verifikation der Lage des Bestrahlungsfeldes im Patienten durch den Einsatz der Positronen-Emissions-Tomographie (Enghardt u. a. 1999).
- Die detaillierte Berücksichtigung der strahlenbiologischen Charakteristik von Ionenstrahlen (Scholz u. a. 1997; Krämer und Scholz 2000).

Seit Dezember 1997 wurden an der GSI 356 Patienten (Stand: Februar 2007) im Rahmen von klinischen Studien erfolgreich mit Kohlenstoff-Ionenstrahlen therapiert. Dabei wurden zuerst Tumore in Hirn-, Schädelbasis- und Sakralbereich und später Tumore längs der Wirbelsäule (z. Z. Prostatakarzinom) bestrahlt. Die Ergebnisse der bereits abgeschlossenen Studien bestätigten die erwartete hohe Effizienz des neuen Therapieverfahrens (Debus u. a. 2000; Schulz-Ertner u. a. 2004a, b, 2007). Die Strahlentherapie mit Kohlenstoff-Ionen ist demnach für die untersuchten Tumorarten eine effektive Behandlungsmethode mit hoher lokaler Kontrollrate und geringen Nebenwirkungen.

Aufbauend auf den Erkenntnissen und Erfahrungen des Pilotprojekts an der GSI sollen in einer der Radiologischen Universitätsklinik Heidelberg angegliederten Therapieanlage ab Anfang 2008 mehr als 1000 Patienten pro Jahr behandelt werden (Übersicht in: Haberer u. a. 2004). Die Inbetriebnahme dieser Klinikanlage ist fast abgeschlossen, mindestens vier weitere Anlagen desselben Prinzips werden in den nächsten Jahren in Europa gebaut (in Marburg, Italien (Pavia), Österreich (Wien), Frankreich (Lyon), Übersicht in: Amaldi und Kraft 2005).

Für den Heilungserfolg einer Tumorthherapie ist neben der lokalen Kontrolle des Primärtumors auch entscheidend, dass keine Spätkomplikationen wie z. B. Sekundärtumoren, Fibrose oder andere pathologische Veränderungen im mitbestrahlten gesunden Gewebe entstehen (Übersicht in: Blakely und Chang 2004). Dies gilt besonders für junge Patienten, da bei ihnen der Wachstums- und Entwicklungs-Prozess noch nicht abgeschlossen ist und der Zeitraum für die Ausbildung von Spätschäden nach der Therapie besonders lang ist (Übersicht in: Taylor 2003; Saran 2004; Wilson u. a. 2005).

Die beim Einsatz von Ionenstrahlen niedrigeren Belastung des gesunden Gewebes lässt zwar ein im Vergleich zur herkömmlichen Photonentherapie geringeres Risiko für die Entstehung von sekundären Tumoren erwarten (Blakely und Chang 2004, Übersicht in:), die Untersuchung der Strahlenwirkung an *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellsystemen ist jedoch ein notwendiges Mittel, um die Unsicherheiten hinsichtlich der langfristigen Wirkung von schweren Ionen zu reduzieren (Borgmann u. a. 2002, Übersicht in:). Die Ziele sind dabei, die Mechanismen zu verstehen, die zur Ausbildung von Spätschäden führen, die Morbidität sekundärer Tumoren abzuschätzen und Strategien zu ihrer Vermeidung zu entwickeln.

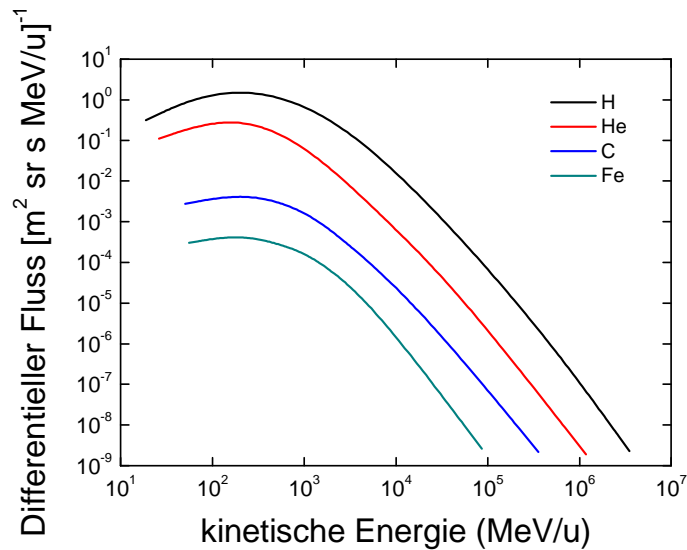


Abbildung 2.10: Hauptbestandteile der primären kosmischen Strahlung. Grafik nach Simpson (1983)

2.4.2 Bemannte Raumfahrt

Der Schutz der in den Weltraum reisenden Menschen vor kosmischer Strahlung ist eine große Herausforderung der bemannten Raumfahrt (Übersicht in: Cucinotta u. a. 2001; Cucinotta und Durante 2006). Die Durchführung von Langzeit-Missionen im Weltraum wird derzeit von den Unsicherheiten bei der Risikoabschätzung kosmischer Strahlung limitiert (Fujitaka u. a. 1999). Die kosmische Strahlung setzt sich zum überwiegenden Teil aus hochenergetischen Kernen zusammen, dabei handelt es sich zu 99 % um Protonen und α -Teilchen, Kohlenstoff-Ionen stellen drittgrößten Anteil. Die Häufigkeit von Eisenkernen liegt zwar nur im Promillebereich, ihre Dosisdeposition ist jedoch auf Grund ihrer hohen effektiven Ladung 676 Mal größer als die von Protonen (Übersicht in: Eidelman u. a. 2005). Nach aktuellem Wissensstand sind die von der kosmischen Strahlung ausgehenden Hauptrisiken die Entstehung von Tumoren, Katarakten, Schädigungen des Nervensystems und andere degenerative Effekte (Übersicht in: Blakely 2001). Um die Unsicherheiten bei der Einschätzung dieser Risiken reduzieren zu können, ist die fundierte Kenntnis der biologischen Wirkungsweise der kosmischen Partikel notwendig. Ziel ist dabei zum einen die Entwicklung voraussagender Tests, mit denen das individuelle Strahlenrisiko abgeschätzt werden soll, zum anderen auch das Sammeln von Informationen über die Strahlenwirkung verschiedener Teilchenarten und -energien, die für die Entwicklung gezielter Schutz- und Abschirmmaßnahmen benötigt werden (Durante 2004).

3 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit war, den Übergang normaler Vorhautfibroblasten in den Zellzyklusarrest und die vorzeitige Alterung nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen bzw. 250 kV Röntgenstrahlen in Langzeitkulturen über mehrere Monate zu untersuchen. Der Ablauf der dazu durchgeführten Experimente wird in Abbildung 3.1 skizziert, die einzelnen Schritte werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Die zur Durchführung der Experimente verwendeten Materialien sind im Anhang unter den angegebenen Abschnitten aufgeführt:

Anhang A.1 Zellkulturmedien und Zusatzstoffe

Anhang A.2 Chemikalien und Kits

Anhang A.3 Lösungen und Puffer

Anhang A.4 Antikörper

Anhang A.5 Sonstige Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Untersuchungen mit Chemikalien in Analysequalität und bei Raumtemperatur durchgeführt. Das zum Ansetzen von Lösungen und Puffern und zum Spülen von Präparaten verwendete ultrareine Wasser (Resistivität $\rho = 182 \text{ k}\Omega\text{m}$) wurde in einem mehrstufigen Wasseraufbereitungssystem (Millipore, Schwalbach) produziert.

3.1 Zellen und Zellkulturmethoden

3.1.1 Verwendete Fibroblasten

Die in der vorliegenden Arbeit mit AG 1522 bezeichneten Zellen wurden vom Coriell Institute of Medical Research (Camden, NJ, USA) bezogen (Verwahrungsnummer AG01522, Charge D). Bei diesen Zellen handelt es sich um Vorhautfibroblasten eines gesunden, 3 Tage alten, männlichen Spenders. Die Zellen wurden im Vorfeld fünf Mal subkultiviert und ihre kumulative Zahl der Verdopplungen (CPD) betrug 16. AG 1521 sind Vorhautfibroblasten eines 3 Tage alten männlichen Spenders, die AG 1521E6 Fibroblasten sind ein Derivat der AG 1521 Fibroblasten, die mit dem E6 Gen des humanen Papillomvirus 16 (HPV16) transfiziert wurden. Die GM 3348 Fibroblasten sind Hautfibroblasten aus der Leistengegend eines 10 Jahre alten männlichen Spenders. AG 1521 und GM 3348

Ablauf der Experimente

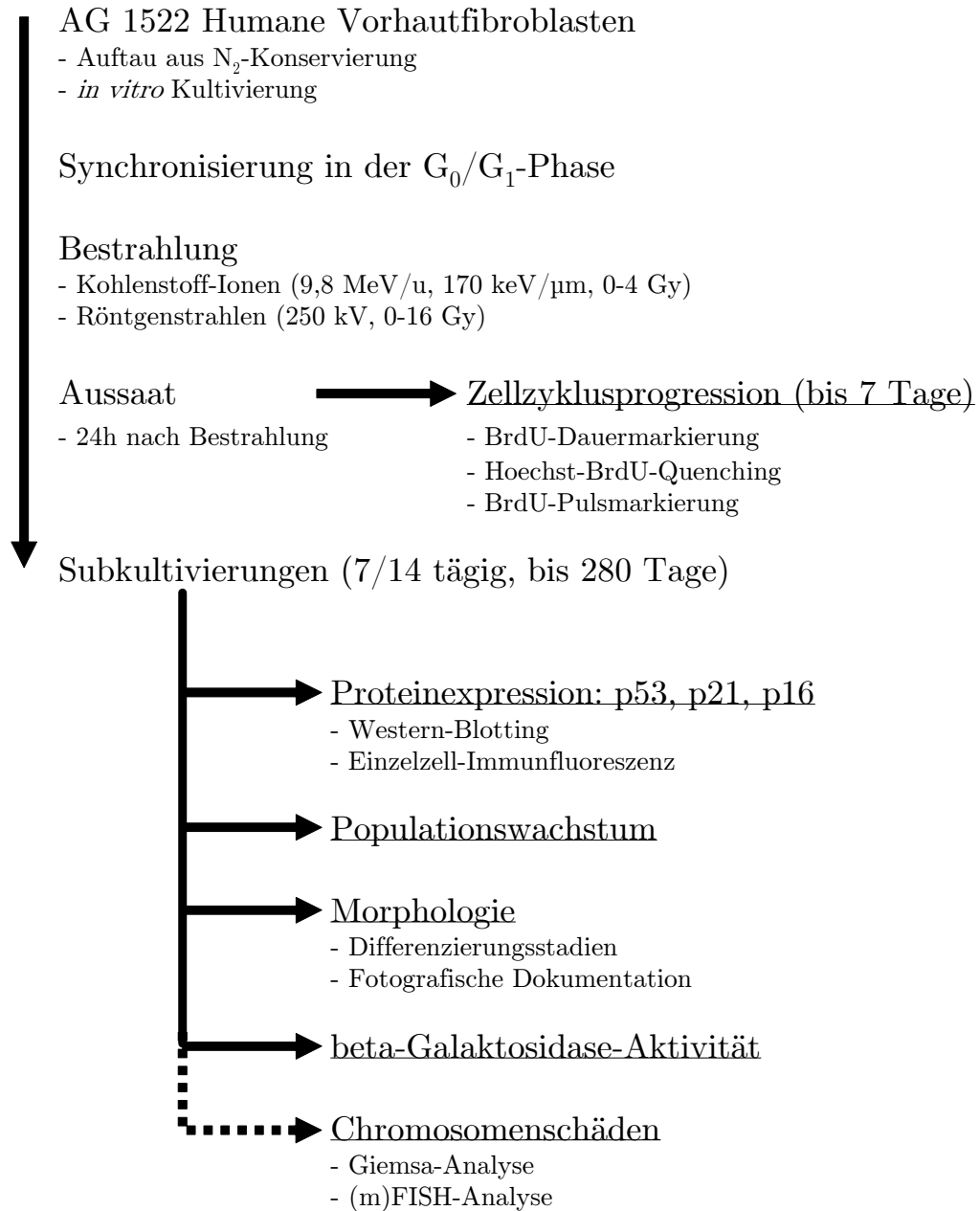


Abbildung 3.1: Ablauf der Experimente: Humane Vorhautfibroblasten wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut, zur Vermehrung subkultiviert und in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Die synchronisierten Zellen wurden mit Kohlenstoff-Ionen oder Röntgenstrahlen bestrahlt bzw. als scheinbestrahlte Kontrollen mitgeführt. Nach Aussaat der Zellen wurde die Zellzyklusprogression gemessen und die Zellen in regelmäßigem Abstand subkultiviert. Parallel zur Subkultivierung wurden Zellen entnommen und die angegebenen Endpunkte untersucht.

wurden ebenfalls vom Coriell Institute of Medical Research bezogen. Die AG 1521E6 Fibroblasten wurden von Tsang u. a. (1995) transfiziert und freundlicherweise von Professor Little (Department of Genetics and Complex Diseases, Boston, MA, USA) und Professor Wenz (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Mannheim) zur Verfügung gestellt. Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich mit AG 1522 Fibroblasten durchgeführt.

3.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in verschiedenartigen Zellkulturgefäßen in Inkubatoren als Monolayer kultiviert. Während der Inkubation der Zellen waren die Kulturgefäße so verschlossen, dass ein Gasaustausch mit der Inkubatoratmosphäre möglich war. Arbeiten mit lebenden Zellen fanden in halb geschlossenen, sterilen Arbeitsbänken mit laminarem, gefilterten Luftstrom statt (Flow-box), wobei sie nur mit sterilen Materialien in Kontakt kamen. Die Zellen wurden mit den im Anhang A.1 aufgeführten Kulturmedien kultiviert. Um eine ausreichende Sauerstoffdiffusion zu gewährleisten, wurde das Volumen des Kulturmediums so gewählt, dass die Zellen mit 2 mm Kulturmedium überschichtet waren. Das Kulturmedium der Zellen wurde, sofern nicht anders angegeben, im Abstand von 3 und 4 Tagen ausgetauscht.

3.1.2.1 Subkultivierung

Das Kulturmedium wurde abgenommen und Mediumreste mit Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung (Trypsin-EDTA) abgespült. Die adhärennten Zellen wurden anschließend durch Einwirkung von 1 ml Trypsin-EDTA pro 25 cm² Kulturgefäßfläche vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst (Einwirkdauer: ca. 5 Minuten bei 37 °C). Die abgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen in einer Glaspipette vereinzelt und die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und mit isotonischer Lösung verdünnt. Diese Verdünnung (max. 800 Zellen/ml) wurde in einem elektronischen Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen) mittels Pulsflächenanalyse gezählt, wobei neben der Zellkonzentration auch Zelldurchmesser und -volumen bestimmt wurden. Die Zellkonzentration wurde anschließend mit Kulturmedium auf den gewünschten Wert eingestellt und die Zellsuspension den Versuchsbedingungen entsprechend auf sterile Kulturgefäße verteilt und im Inkubator kultiviert.

3.1.2.2 Bestrahlungsexperimente

In einem Teil der Bestrahlungsexperimente wurde den Zellen zwischen Bestrahlung und Aufarbeitung ein Erholungszeitraum gegeben. Dazu wurde das konditionierte Kulturmedium vor der Bestrahlung durch serumfreies Medium ersetzt und dieses nach der Bestrahlung wieder durch das konditionierte Medium ausgetauscht und die Zellen für

weitere 24 Stunden inkubiert. Alle Experimente wurden mit dem Monat und Jahr des Experimentbeginns bezeichnet. Als Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Passagen wurden 7 bzw. 14 Tage gewählt. Im Experiment „4/04“ wurde im Abstand von 7 Tagen passagiert, die Entwicklung der bestrahlten Zellen deutete jedoch darauf hin, dass dieses Passageintervall auf Dauer zu einem erhöhten Zellverlust in der Zellkultur führte. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden die Passagen im Experiment „8/04“ im Abstand von 14 Tagen durchgeführt, wobei die Reaktion auf die Bestrahlung jedoch abgeschwächt auftrat. Um auch diesen Einfluss zu berücksichtigen, wurden im Experiment „2/05“ die ersten vier Passagen im Abstand von 7 Tagen durchgeführt und danach alle 14 Tage passagiert. In den Experimenten „6/05“ und „7/05“ wurde die erste Passage nach 7 Tagen und die weiteren im Abstand von 14 Tagen durchgeführt, wodurch der frühe Zeitraum abgedeckt werden konnte, aber auch der mit den Subkultivierungen einhergehende Stress bei längerer Kultivierung möglichst niedrig gehalten wurde.

3.1.2.3 Langzeitkonservierung

Alle Experimente wurden mit Zellen aus dem gleichen Vorrat an Stammkulturen durchgeführt. Die Stammkulturen wurden in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff (Siedepunkt: ca. 196 °C) gelagert. Zur Verwendung der Zellen wurde das Kryogefäß mit den Zellen aus dem Stickstoff geholt, schnell in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in ein Kulturgefäß mit vorgewärmten Kulturmedium überführt und für 4 Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium ausgetauscht und die Anzahl an nicht angehefteten Zellen im alten Medium bestimmt. Der Anteil angehefteter Zellen lag im Durchschnitt bei etwa 80 %.

Zur Kryokonservierung von bereits kultivierten Zellen wurden die Zellen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben abgelöst und abzentrifugiert (179 g, 6 Minuten). Nach Verwerfen des Mediumüberstandes wurde die Zellkonzentration mit Tiefkühlmedium (Anhang A.1) auf $1,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und je 1,8 ml der Suspension in ein Kryogefäß gegeben (Gesamtzellzahl: $2 \cdot 10^6$ Zellen). Die Kryogefäße wurden in Isopropanol-Einfrierbehältern für 24 Stunden bei -80 °C gelagert und anschließend in die flüssige Phase des Stickstoffs überführt.

3.1.2.4 Sterilisation und Inaktivierung

Lösungen, Kunststoffgefäße und Pipettenspitzen wurden 25 Minuten bei 2 bar und 120 °C durch Autoklavieren sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mit autoklavierbarem Wasser angesetzt und sterilfiltriert (Porendurchmesser: 0,2 µm). Glaswaren wurden im Trockensterilisator bei 180 °C für 6 Stunden sterilisiert. Magazine zur Bestrahlung wurden mit 70 % Ethanol benetzt und zusätzlich unter UV-Licht sterilisiert. Flüssige und feste Abfälle, die mit GVOs, Karzinomzellen oder instabilen karzinogenen Substanzen kontaminiert waren, wurden vor ihrer Entsorgung durch Autoklavieren (2 bar, 180 °C, 6 Stunden) inaktiviert. Die für die Kultivierung der Zellen verwendeten Inkubatoren

wurden in regelmäßigen Abständen durch dreistündiges Erhitzen auf 180 °C sterilisiert.

3.2 Charakterisierung der Zellen

3.2.1 Bestimmung der Wachstumskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik wurden die AG 1522 Fibroblasten in einer Zelldichte von 800 Zellen/cm² und 10 000 Zellen/cm² ausgesät. In einem Zeitraum von bis zu 28 Tagen wurden in regelmäßigen Abständen Zellzahl und Zellvolumen aus vier Parallelproben bestimmt. Zum Vergleich wurde die Entwicklung von drei anderen Fibroblasten-Zell-Linien, AG 1521, AG 1521E6 und GM 3348, untersucht.

3.2.2 Bestimmung des Alters der Zellpopulationen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Endpunkten war eine Abhängigkeit vom Alter der verwendeten Zellen zu erwarten. Das Alter der Zellpopulation wurde daher in jedem Experiment dokumentiert. Üblicherweise wird die mittlere Anzahl an durchlaufenen Zellteilungen als Alter einer Zellpopulation definiert und als CPD für die Gesamtkultur angegeben. Zur Berechnung der CPD nach Gleichung 3.1 wurde nach jeder Passage (Subkultivierung) eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

$$CPD_n = \sum_{i=1}^n \frac{\ln \frac{N_i}{N_{i-1}}}{\ln 2} \quad (3.1)$$

- n : aktuelle Passage
- CPD_n : Alter bei der aktuellen Passage
- N_i : Zellzahl (geerntet)
- N_{i-1} : Zellzahl (eingesät)

3.2.2.1 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit

Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von ca. 7 Zellen/cm² für drei unabhängige Bestimmungen ausgesät und in Kulturmedium kultiviert, das 20 % fötales Kälberserum (FCS) enthielt. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht. 14 Tage nach der Aussaat wurden die Zellen mit Methylenblau-Lösung (Abschnitt A.3) fixiert, gefärbt (60 Minuten) und mit einer Stereolupe ausgewertet. Die Anhäufung von mehr als 50 Zellen wurde als eine Kolonie gezählt. Das Verhältnis der gezählten Kolonien zur eingesäten Zellzahl ergibt die Koloniebildungsfähigkeit (plating efficiency, PE, Gleichung 3.2). Die Ergebnisse von vier Experimenten mit insgesamt zwölf Bestimmungen ergaben für die

Koloniebildungsfähigkeit der AG 1522 Fibroblasten im Durchschnitt 0,28 bei einer Standardabweichung von 0,11.

$$PE = \frac{N_K}{N_0} \quad (3.2)$$

PE : Koloniebildungsfähigkeit
 N_K : Anzahl der Kolonien
 N_0 : Ausgesäte Zellzahl

3.2.3 Bestimmung der Zellzyklus-Synchronisierung

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Experimente mit Fibroblasten durchgeführt, die sich nach Kontaktinhibition in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus befanden. Zur Synchronisierung wurden die Zellen in einer Dichte von 10^4 Zellen/cm² ausgesät und für 14 Tage kultiviert, bis die Zellen konfluent gewachsen waren und sich die Zellzahl in Folge der Kontaktinhibition nicht weiter erhöhte. Der letzte Austausch des Kulturmediums wurde 3 Tage vor dem experimentellen Einsatz der Zellen durchgeführt. Die Synchronisierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus wurde mittels Flusszytometrie untersucht. Dazu wurde bei der Aufarbeitung der bestrahlten konfluenten Zellen ein Aliquot aus der Zellsuspension entnommen und mit Hoechst-33258 Lösung (Anhang A.3) fixiert, gefärbt und 30 Minuten später im UV-Kanal des Durchflusszytometers PAS III (Partec, Münster) bei Raumtemperatur gemessen und so ihr Gehalt an DNA bestimmt. Aus dem gemessenen Intensitäts-Häufigkeits-Spektrum wurden mit einer Software (MultiCycle, Anhang A.5) die Anteile an Zellen mit einfachem, doppelten oder dazwischen liegendem DNA-Gehalt errechnet. Der Anteil an Zellen mit einfachem DNA-Gehalt entsprach dem Anteil der Zellen in der G_0/G_1 -Phase.

3.2.4 Bestimmung der Zellkernfläche

Die Zellkernfläche wurde an konfluenten Fibroblasten 14 Tage nach Aussaat und 3 Tage nach dem letzten Austausch des Kulturmediums bestimmt, was dem Zeitpunkt und der Situation bei den Bestrahlungsexperimenten entsprach. Vor der Fixierung wurde der Mediumüberstand entfernt und der Zellrasen gespült (PBS^{w/o}). Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten im Glutaraldehyd-Fixans (20 % v/v in PBS^{w/o}) fixiert und nach einer weiteren Spülung mit PBS^{w/o} für 30 Minuten mit Hoechst-33258-Färbelösung (Anhang A.3) überschichtet. Der in die DNA inkorporierte Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst-33258) wurde im Mikroskop (DMIRE2, Leica, Bensheim) durch UV-Licht angeregt und die fluoreszierenden Zellkerne mittels einer digitalen CCD-Kamera fotografiert (Sensicam, Leica Bensheim). Zur Umrechnung von Bildpunkten in Flächenmaße wurden definierte Längenmaßstäbe fotografiert und zur Kalibrierung benutzt.

Die aufgenommenen Zellkerne wurden mit zwei verschiedenen Analyseprogrammen ausgewertet (siehe Anhang A.5): Bei der semi-automatischen Flächenbestimmung wurden einzelne Zellkerne manuell selektiert und eine automatische Randerkennung durchgeführt. Die dabei umrandete Fläche wurde von der Software errechnet. In der automatischen Auswertung mit der Software ImageJ wurden alle Bilder mittels einer dafür geschriebenen Befehlsfolge bearbeitet: Eine konvolutionsbasierte Randerkennung wurde durchgeführt und alle nicht-überlappende Zellkerne detektiert und vermessen, wodurch eine bedeutend höhere Anzahl an ausgemessenen Zellkernen erreicht werden konnte. Die Parameter für die automatische Analyse wurden an Stichproben von Bildern so bestimmt, dass ihre Ergebnisse mit denen der semi-automatischen Analyse vergleichbar waren. Zusätzlich wurde auch die Anzahl an Zellen in der Mitose manuell ausgezählt und auf die Gesamtzahl der Zellkerne bezogen.

3.2.5 Test auf Befall mit Mykoplasmen

Alle verwendeten Zellkulturen wurden regelmäßig auf einen Befall mit Mykoplasmen kontrolliert. Der beim Austausch des Kulturmediums anfallende Überstand wurde dazu auf spezies-spezifische 16S ribosomale RNA verschiedener Mykoplasmenarten hin untersucht. Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen mittels eines handelsüblichen Polymerase-Kettenreaktionstests (Anhang A.2) zeigten, dass alle verwendeten Zellen während der gesamten Dauer der Experimente frei von Mykoplasmen waren.

3.3 Bestrahlungsmethoden

Es wurden in allen Bestrahlungsexperimenten Zellen verwendet, die zuvor nach dem in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Protokoll in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus synchronisiert worden waren. In allen Bestrahlungsexperimenten wurden zur Kontrolle scheinbestrahlte Zellen mitgeführt, die bis auf die unterlassene Bestrahlung genau so behandelt wurden, wie die bestrahlten Zellen. Die Subkultivierung der bestrahlten Populationen erfolgte nach dem im Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen Schema.

3.3.1 Bestrahlung mit schweren Ionen

Für die Bestrahlung am UNILAC wurden die Zellen in Kulturschalen (\varnothing 35 mm) ausgesät. Vor der Bestrahlung wurde der Mediumüberstand entfernt. Anschließend wurden die offenen Kulturschalen hochkant in mit serumfreien Medium gefüllte Magazine eingesetzt (maximal 20 Proben pro Magazin). Die Magazine wurden luftdicht verschlossen und in einem verschlossenen Behälter zum Bestrahlungsplatz X6 gebracht und in die sterile biologische Bestrahlungsanlage (Kraft u. a. 1980; Becher u. a. 2001) eingesetzt und geöffnet. Die einzelnen Kulturschalen des Magazins wurden nacheinander mit einem Sauggreifer nach oben aus dem Magazin gehoben und im horizontalen Strahlengang des

Beschleunigers positioniert. In dieser Position wurden die Zellen mit der festgelegten Dosis bestrahlt. Die Bestrahlung einer Probe dauerte weniger als 30 Sekunden. Nach der Bestrahlung wurde die Probe wieder in das Magazin abgesetzt und dieses verschlossen zur Aufarbeitung der Zellen gebracht.

Die am UNILAC verfügbaren niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen besitzen nur eine Eindringtiefe von etwa 400 μm , weswegen die Zellen in offenen Kulturschalen bestrahlt werden. Beim Herausheben der Kulturschalen aus dem Magazin fließt der Großteil des Kulturmediums ab, so dass die Zellen nur von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt werden. Die Form der Kulturschalen bedingt aber ein unvollständiges Abfließen des Kulturmediums, wodurch sich am unteren Rand der Kulturschale ein Flüssigkeitstropfen sammelt. Die Zellen hinter diesem Tropfen entgehen der Bestrahlung und wurden deshalb vor der Aufarbeitung entfernt, indem die am gesamten Kulturschalenrand liegenden Zellen mit einem sterilen Wattestäbchen großflächig weggewischt wurden. Die Kulturschale wurden anschließend im Mikroskop auf zurückbleibende Zellen kontrolliert und, falls erforderlich, erneut gewischt.

$$F\left[\frac{1}{\text{cm}^2}\right] = 0,625 \cdot 10^9 \cdot \frac{D[\text{Gy}] \cdot \rho\left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3}\right]}{LET[\text{keV}/\mu\text{m}]} \quad (3.3)$$

$$N_p[\text{Pulse}] = \frac{F\left[\frac{1}{\text{cm}^2}\right]}{K\left[\frac{1}{\text{Pulse} \cdot \text{cm}^2}\right]} \quad (3.4)$$

$$D[\text{Gy}] = 1,6 \cdot 10^{-9} \cdot LET[\text{keV}/\mu\text{m}] \cdot F\left[\frac{1}{\text{cm}^2}\right] \cdot \frac{1}{\rho}\left[\frac{\text{cm}^3}{\text{g}}\right] \quad (3.5)$$

D	: Strahlendosis
LET	: linearer Energietransfer
F	: Teilchenfluenz
ρ	: Dichte des Strahlziels
K	: Kalibrierungsfaktor
N_p	: Anzahl der Pulse

Die Dosis am UNILAC wird durch die Bestrahlung mit der entsprechenden Anzahl an Strahlpulsen appliziert. Die Anzahl der für eine bestimmte Dosis benötigten Pulse berechnet sich nach den Gleichungen 3.3 und 3.4, mit Gleichung 3.5 lässt sich die aus Fluenz und LET resultierende Dosis berechnen. Die zum Bestrahlen verwendeten Kohlenstoff-Ionen besaßen am Strahlziel eine Energie von 9,8 MeV/u, der LET betrug 170 keV/ μm . Die Dichte des Strahlziels war die von Wasser ($\approx 1 \text{ g}/\text{cm}^3$). Zur Ermittlung des Kalibrierungsfaktors wurden Kernspurdetektoren aus CR-39 mit einer definierten Anzahl an Pulsen bestrahlt und die nach Ätzung mit 11 molarer Natronlauge sichtbaren Teilchenspuren pro Flächeneinheit gezählt. Die Anzahl der eingestrahlteten Strahlpulse wurde

über einen Sekundärelektronen-Transmissionszähler gesteuert, dessen Sekundärelektronenstrom proportional zur Strahlintensität ist.

3.3.2 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Bei der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wurde der Mediumüberstand entfernt und die Zellen mit dem gleichen Volumen serumfreien Mediums überschichtet. In der Röntgenanlage (IV-320-12, Seifert, Bridge Port, USA) wurden die Kulturgefäße in waagrechter Position von oben bestrahlt. Zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde eine IV320-13 Röntgenröhre verwendet. Die verwendete Beschleunigungsspannung betrug 250 kV und der Kathodenstrom 16 mA. Die Röhre besitzt eine Wolfram Anode und drei Filter (Beryllium, Aluminium und Kupfer) mit 7 mm, 1 mm und 1 mm Dicke. Der Fokusabstand und damit die homogen bestrahlbare Fläche wurde der Größe der zu bestrahlenden Kulturgefäße angepasst. Die Homogenität der Bestrahlung wurde durch Messung der Dosisleistung an den Rändern der Bestrahlungsfläche kontrolliert. Dosis und Dosisleistung wurden mit einem Dosimeter DL4 (Pychlau, Freiburg) ermittelt, das nach Fricke und Hart (1966) kalibriert wurde.

3.4 Analysemethoden

3.4.1 Analyse der Zellzykluskinetik

3.4.1.1 Immunocytochemische Detektion der BrdU-Inkorporation

Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von $2 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Kulturschalen ausgesät und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium gegen BrdU-haltiges (10 µmol/l) Medium ausgetauscht und die Zellen für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Mediumüberstand entfernt, die Zellen drei Mal mit PBS^{w/o} gespült und mit Fixierlösung überschichtet (–20 °C, 30 Minuten, Tabelle A.20). Nach drei Spülschritten mit PBS^{w/o} wurden die Zellen mit einer Lösung des BrdU-Antikörpers (gebrauchsfertig im Kit, siehe Anhang A.7) benetzt (13 µl/cm²), mit Polyethylen-Folie bedeckt und inkubiert (eine Stunde, 37 °C). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde jede Kulturschale mit PBS^{w/o} gefüllt und die nun auf der Spüllösung schwimmende Polyethylen-Folie entfernt. Nach zwei weiteren Spülungen mit PBS^{w/o} wurden die Zellen mit einer Lösung eines Fluorescein-gekoppelten Sekundärantikörpers (gebrauchsfertig im Kit, siehe Anhang A.7) benetzt (13 µl/cm²), mit Polyethylen-Folie bedeckt und inkubiert (eine Stunde, 37 °C). Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde jede Kulturschale mit PBS^{w/o} gefüllt und die Polyethylen-Folie entfernt. Anschließend wurden die Zellen zur Gegenfärbung der Zellkern-DNA mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Lösung (DAPI-Lösung) überschichtet (0,6 µmol/l in PBS^{w/o}, 10 Minuten). Die Detektion mit dem Sekundärantikörper und die DAPI-Färbung fanden in einem abgedunkelten Raum statt.

Nach drei weiteren Spülungen mit PBS^{w/o} wurden im Fluoreszenz-Mikroskop mit einer Software (Anhang A.5) digitale Fotografien der Zellkerne angefertigt: Der Fluoreszenzfarbstoff des Sekundärantikörpers wurde mit Licht der Wellenlänge 450–490 nm angeregt und die Emission bei 515 nm detektiert. Die DAPI-Fluoreszenz der Zellkern-DNA wurde mit 340–380 nm angeregt und die Emission bei 425 nm detektiert. Die Auswertung der Bilder wurde mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MY, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Zellkerne jeder Bilderserie automatisch gezählt. Zur Ermittlung des BrdU-Markierungsindex wurde die Anzahl der BrdU-markierten Zellkerne mit der Gesamtzahl an Zellkernen ins Verhältnis gesetzt.

3.4.1.2 Durchflusszytometrie

Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von $5 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Kulturschalen ausgesät und mit Kulturmedium, dem BrdU zugegeben wurde (10 µmol/l) im Dunkeln inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit Kulturmedium verdünnt und abzentrifugiert (500 g, 6 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurde unter ständigem Verwirbeln Ethanol zugetropft (70 % in H₂O, –20 °C, ca. 4 ml/10⁵ Zellen) und die Zellen für 2 Stunden bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g, 6 Minuten) und nach Verwerfen des Überstandes in PBS^{w/o} resuspendiert. Nach Zugabe von RNase-Lösung (20 µg/10⁴ Zellen) wurden die Zellen 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem RNase-Verdau wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g, 6 Minuten) und nach Verwerfen des Überstandes in Hoechst-33258-Färbelösung (Anhang A.3) resuspendiert (ca. 4 ml/10⁵ Zellen) und für mindestens eine Stunde bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung gegengefärbt (6 µg/10⁴ Zellen) und nach mindestens einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur gemessen.

Im Flusszytometer wurde von jeder Zelle die Intensität des von den inkorporierten Fluoreszenz-Farbstoffen emittierten Fluoreszenzlichts gemessen: Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde bei 488 nm durch einen Ar-Ion Laser angeregt und zwischen 620 nm und 750 nm detektiert. Das an den Adenin-Thymin Basenpaaren der DNA angelagerte Hoechst-33258 wurde bei 360 nm durch UV-Licht angeregt und zwischen 420 nm und 480 nm detektiert. Die Messwerte wurden gespeichert und zur Auswertung in eine Darstellung aufgetragen, die auf den x- und y-Achsen die Fluoreszenzintensität (x: Hoechst-33258, y: Ethidiumbromid) und auf der z-Achse die Häufigkeit der Ereignisse zeigte.

Die Auswertung des gemessenen Spektrums wurde mit der Software MultiCycle (Anhang A.5) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen im Spektrum zuerst nach der Anzahl ihrer Zellzyklus-Durchläufe seit ihrer Neuaussaat in Subpopulationen eingeteilt. Die zu den Subpopulationen gehörenden Ethidiumbromid-Spektren wurden einer Zellzyklus-Analyse unterzogen, wobei die Anteile an Zellen in der G₀/G₁ und G₂-Phase durch Anpassung zweier Normalverteilungen und die in der S-Phase durch Anpassung eines Polynoms zweiten Grades angenähert wurden (Dean und Jett 1974). Aus den dabei

erhaltenen Werten wurde anschließend berechnet, welcher Anteil an Zellen sich in einer bestimmten Phase des ersten, zweiten oder dritten Zellzyklus-Durchlaufs nach der Neuaussaat befand.

3.4.2 Proteindetektion von Zellextrakten

3.4.2.1 Herstellung der Zellextrakte

Alle folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis oder in gekühlten Zentrifugen (4 °C) statt und wurden mit Lösungen durchgeführt, die auf 4 °C vorgekühlt waren. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen eine Minute mit Trypsin-EDTA überschichtet ($\approx 15 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) und danach mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem fünffachen Volumen an Kulturmedium verdünnt und in ein vorgekühltes Kunststoff-Zentrifugengefäß überführt. Eventuell im Kulturgefäß verbleibende Zellen wurden durch Zugabe von weiterem Medium aufgenommen und ebenfalls in das Zentrifugengefäß überführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (107 g, 10 Minuten) wurde der Mediumüberstand verworfen und die Zellen nach ihrer Resuspendierung in phosphatgepufferter Saline (PBS^{w/o}) aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (107 g, 10 Minuten) wurde der PBS^{w/o}-Überstand verworfen und die Zellen mit einem geringen Volumen an PBS^{w/o} resuspendiert und in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß aus Kunststoff überführt. Nach weiterer Zentrifugation (700 g, 15 Minuten) wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit 50 μl Lysepuffer pro 10^6 Zellen (Tabelle A.8) überschichtet, mit einer Spritze (1 ml, Kanüle: 0,40 x 12 mm) vereinzelt und für 30 Minuten lysiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert ($1,3 \cdot 10^6$ g, 15 Minuten), der Überstand in ein 1,5 ml Kunststoffgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -20°C eingefroren.

3.4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Verdünnung des Proteinextrakts auf Verdünnungen von Proteinlösungen mit bekannter Konzentration bezogen (Bradford 1976). Dazu wurde dem Zellextrakt 1 μl entnommen und 1:200 mit Lysepuffer-Verdünnung (1:200 v/v Lysepuffer in Wasser) gemischt. Die Referenzproben wurden aus einer Stammlösung mit 1,4 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) durch Verdünnung mit Lysepuffer-Verdünnung auf Proteinkonzentrationen von 5, 10, 20 und 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA hergestellt. Die Probe- und Referenzverdünnungen wurden 1:5 mit BRADFORD-Lösung in einer Mikrotiterplatte verdünnt und ihre optische Dichte bei 570 nm in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten (Bio-Tek, Bad Friedrichshall) gemessen.

3.4.2.3 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese

Das der aufzutrennenden Proteinmasse entsprechende Volumen des Proteinextrakts wurde mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer (10 % v/v 2-Mercaptoethanol in Probe-

puffer, Anhang A.3) gemischt und zur Denaturierung der Proteine für 10 Minuten auf 80 °C erhitzt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel (Sammelgel: 3,2 %, Trenngel: 15 %, siehe Tabellen A.10 und Tabelle A.11) aufgetragen und bei 16 mA elektrophoretisch zusammen mit Standardmarkern so lange aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande des Auftragspuffers das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel befand sich dabei in einem Laufpuffer (Anhang A.3). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Proteine mittels *Western-Blotting* weiterbehandelt.

3.4.2.4 Proteintransfer mittels *Western-Blotting*

Das Gel wurde in Transferpuffer (Anhang A.3) equilibriert und auf einem Whatman-Papier blasenfrei mit einer Polyvinylidenfluorid-Membran bedeckt, die nacheinander in Methanol, Wasser und Transferpuffer equilibriert worden war. Die Membran wurde mit einem weiteren Whatman-Papier bedeckt, der gesamte Verbund auf die Maße des Gels zurechtgeschnitten und zwischen zwei Schwämmen in die mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte *Blotting*-Apparatur geklemmt. Die Apparatur wurde während des Blottens auf 4 °C gekühlt und der Transferpuffer mit einem Magnetrührer zirkuliert. Durch Anlegen einer Spannung von 20 V wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran übertragen. Bei einer resultierenden Stromstärke von ca. 55 mA wurde eine Blotzeit von 14 Stunden gewählt.

3.4.2.5 Immundetektion

Die Membran wurde vom Gel abgehoben, für 10 Minuten gespült (Tris-gepufferte-Saline-Tween-20 (TBST), Anhang A.3) und unspezifische Bindungsstellen für 2 Stunden in Blocking-Lösung abgesättigt (Anhang A.3). Um verschieden große Proteine gleichzeitig detektieren zu können, wurde die Membran senkrecht zur Laufrichtung bei einer Markerposition von 25 kD durchgeschnitten. Anschließend wurden die Membranstücke auf der vormalig dem Gel zugewandten Seite mit der Primärantikörper-Verdünnung (Antikörper in Blocking-Lösung) überschichtet. Nach 2 Stunden Inkubation wurden die Membranstücke drei Mal für 10 Minuten in TBST-Waschpuffer gespült. Anschließend wurden die Membranstücke mit der Verdünnung eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörpers überschichtet und für eine Stunde inkubiert und zuletzt sechs Mal für 10 Minuten in TBST-Waschpuffer gespült. Die bei der Detektion verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und ihre Konzentrationen sind im Anhang A.4 aufgeführt.

Nach der Immundetektion wurden die Membranen für 10 Minuten mit einer chemolumineszenz Substratlösung equilibriert (ECL+, Anhang A.2) und nach Entfernen der überschüssigen Substratlösung in eine Polyethylenfolie eingeschweißt und in eine Filmkassette eingeklebt. Das bei der Chemolumineszenz emittierte Licht wurde mit Filmen für die Autoradiographie (Hyperfilm ECL, Anhang A.2) in Zeiträumen von einer Sekunde bis 30 Minuten detektiert. Jeder Film wurde zur späteren Kalibrierung vor seiner Expo-

sition mit 21 definierten Dichtestufen (5 % von Stufe zu Stufe) in einem Sensitometer (Pehamed, Sulzbach) belichtet. Die exponierten Filme wurden in einer Entwicklermaschine für Röntgenfilme (AGFA, Köln) entwickelt.

Wenn eine weitere Immundetektion auf der Membran durchgeführt werden sollte, wurde die Membran zuerst für 10 Minuten in TBST Waschpuffer gespült. Zur Entfernung der bereits gebundenen Antikörper wurde die Membran anschließend in einem Ablöse-Puffer gewaschen (30 Minuten, 50 °C, Anhang A.3). Die Immundetektion wurde danach mit den nach dem Blotten folgenden Schritten fortgesetzt.

3.4.2.6 Quantitative Analyse von *Western-Blotting* Signalen

Die auf den Filmen abgelichteten Proteinsignale wurden mit einem Laser-Filmdigitalisierer (Kodak, Stuttgart) digitalisiert. Die Nichtlinearität des Filmmaterials wurde dabei durch eine aus den Kalibriersignalen abgeleitete Effizienzfunktion kompensiert. Die beim Scannen gespeicherten Bilder wurden mit der Software Genetools (Syngene, Cambridge, UK) ausgewertet. Dabei wurde das Helligkeitsintegral jedes Proteinsignals bestimmt und davon das Helligkeitsintegral einer gleich großen und signalfreien Fläche zur Hintergrundkorrektur abgezogen. Die dabei ermittelten Werte wurden auf die bei der Elektrophorese aufgetragene Gesamtproteinmenge normiert. Zur Normierung diente das Proteinsignal von Tubulin, das mit der Gesamtproteinmenge korreliert (Fournier u. a. 2003).

3.4.3 Proteindetektion auf Einzelzellebene

3.4.3.1 Detektion der Proteine

Bei der Proteinanalyse mittels *Western-Blotting* werden üblicherweise alle Zellen einer Probe zu einem Lysat verarbeitet und die darin vorhandenen interessierenden Proteine detektiert. Durch die Herstellung des Lysats aus allen Zellen einer Probe ist beim *Western-Blotting* keine Aussage über die Verteilung der Proteine in den einzelnen Zellen möglich. Um die Induktion der Proteine auch in einzelnen Zellen der Population zu verfolgen, wurde eine Analysemethode entwickelt, mit der sich die relative Proteinmenge in einzelnen Zellen quantifizieren ließ.

Für die Untersuchung wurden die Zellen in einer Dichte von 8000 Zellen/cm² auf Objektträgern mit aufgeklebten Kammern ausgesät (siehe Anhang A.5). Die Objektträger besaßen einen Boden aus Glas, was für die Messung Immunfluoreszenz günstiger war als Kulturgefäße aus Kunststoff, da diese eine inhomogene Eigenfluoreszenz zeigten.

Die Fixierung der Fibroblasten erfolgte vor dem Erreichen der Konfluenz. Die Fibroblasten wurden dazu mit PBS^{w/o} gespült und anschließend mit Formaldehyd-Fixierlösung überschichtet (4 % Formaldehyd in PBS^{w/o}, 15 Minuten). Nach dreifacher Spülung mit PBS^{w/o} wurden die Zellen mit Triton X-100 Lösung permeabilisiert (0,5 % v/v in PBS^{w/o}, 7 Minuten) und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-Lösung inkubiert (0,2 % w/v in PBS^{w/o}, mind. 15 Minuten).

Anschließend wurden die Zellen mit einer Lösung des Primärantikörpers benetzt (15 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, Anhang A.4), mit Polyethylen-Folie bedeckt und eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger mit PBS^{w/o} gefüllt und die Polyethylen-Folien entfernt. Nach zwei weiteren Spülungen (5 Minuten, PBS^{w/o}) wurden die Zellen mit einer Lösung eines Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpers (15 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, Anhang A.4) benetzt, mit Polyethylen-Folie bedeckt und inkubiert (45 Minuten, dunkel). Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Objektträger mit PBS^{w/o} gefüllt und die Polyethylen-Folien entfernt. Anschließend wurden die Zellen zur Gegenfärbung der Zellkern-DNA mit DAPI-Lösung überschichtet (0,6 $\mu\text{mol}/\text{l}$ in PBS^{w/o}, 10 Minuten, kein Licht). Nach drei Spülungen mit PBS^{w/o} wurden die Zellen im Inkubator getrocknet (40 °C) und zur Verlangsamung des Ausbleichens mit einem Tropfen ‚Antifade‘ (Anhang A.2) unter Deckgläsern eingedeckt.

Die Objektträger wurden mit dem 40x Objektiv eines rechnergesteuerten Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet, das mit einer digitalen Kamera ausgerüstet war (siehe Anhang A.5). Dabei wurden mit einem LabView-Programm (Anhang A.5) mindestens 50 Bildfelder auf dem Objektträger manuell angefahren und für jede Filtereinstellung ein digitales Bild aufgenommen. Es wurden Filtereinstellungen verwendet mit denen Aufnahmen des Phasenkontrastbildes und der Fluoreszenzen der Farbstoffe DAPI, Alexa-488 und Alexa-568 gemacht werden konnten.

3.4.3.2 Rechnergestützte Auswertung

Die Auswertung der Bilder wurde mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MY, USA) mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Programm durchgeführt. Der Programmdurchlauf gliedert sich dabei in drei Phasen: Zuerst wurde aus den Bildern der DAPI-Fluoreszenz eine binäre Maske erstellt, mit der jeder Zellkern vom restliche Bildinhalt getrennt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Zellkernmaske mit den Bildern der Immunfluoreszenz kombiniert, so dass nur noch die Immunfluoreszenz der Zellkerne sichtbar blieb. Im letzten Schritt wurde die mittlere Fluoreszenzintensität und Fläche jedes einzelnen Zellkerns quantifiziert. Zur Berechnung des Fluoreszenzintegrals wurde die mittlere Fluoreszenzintensität mit der Kernfläche multipliziert. In folgenden Abschnitt ist eine detaillierte Abfolge der Verarbeitungsschritte aufgeführt.

3.4.3.3 Erzeugung der Zellkernmaske

Laden der DAPI-Fluoreszenzbilder

Von der Probe wurden alle Bilder in einen Bildstapel geladen, die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne zeigten. Die folgenden Operationen wurden dann auf den Stapel und damit auf alle Bilder angewendet.

Kontrastverstärkung

Alle Bilder eines Stapels wurden normalisiert, so dass die Helligkeitswerte der einzelnen Bildpixel auf den gesamten verfügbaren Bereich von 8-bit gestreckt wurden.

Z-Projektion/Median

Zur Ausgleichung von Inhomogenitäten, die durch das Aufnahmesystem in die Bilder gelangten, wurde ein Ausgleichsbild generiert. Dazu wurde für jeden Pixel des Ausgleichsbilds der Median aus allen Bildern des Stapels an der entsprechenden Pixelposition bestimmt.

Normierung des Stapels

Die aufnahmebedingten Inhomogenitäten wurden durch Division der Stapelbilder mit dem Ausgleichsbild herausgerechnet.

Hintergrundabzug

Der zwischen den Zellkernen liegende Hintergrund wurde durch einen ‚rolling ball‘-Algorithmus entfernt.

Rauschreduktion mittels Medianbildung

In den Bildern vorhandenes Bildrauschen wurde durch Bildung eines Medians mit einem Radius von 2 Pixeln reduziert. Dabei wurde jeder Pixel durch den Median der im Radius liegenden benachbarten Pixel ersetzt.

Kantenerkennung

Durch die Kantenerkennung wurden starke lokale Änderungen in der Bildhelligkeit verstärkt, wodurch die Ränder der Zellkerne vom Hintergrund abgegrenzt wurden. Da die dabei erzeugten Kernränder über die ursprüngliche Fläche des Kerns hinausragten, wurde der unten aufgeführte Erosionsschritt notwendig.

Konvolution

Durch die Konvolution wurde die Helligkeit der Kernränder verstärkt, so dass sie bei der folgenden automatischen Objekterkennung erfasst werden konnten. Es wurde eine 5x5 Matrix benutzt, die in der Mitte den Wert 24 und im übrigen Teil die Werte -1 enthielt.

Objekterkennung

Vor dem durchführen der Objekterkennung wurde ein Schwellwertbereich von 1–255 festgelegt, mit dem die im vorherigen Schritt erzeugten Kernränder vom Hintergrund abgegrenzt wurden. Für die Objekterkennung wurden die Randbedingungen so festgelegt, dass Objekte, die eine Größe von mindestens $40\text{ }\mu\text{m}^2$ besaßen und bei denen die Kreisförmigkeit ($c = 4\pi \cdot \text{Fläche} / \text{Umfang}^2$) größer als 0,5 war, wodurch Artefakte von der Analyse ausgeschlossen wurden. Bei der Objekterkennung wurden die erkannten Kernränder zu Flächen aufgefüllt und in einem neuen Stapel abgelegt, in dem die Kernflächen den Wert 255 und die dazwischen liegenden Hintergrundbereiche den Wert 0 zugewiesen bekamen.

Erosion

Im neu erzeugten Kernmasken-Stapel wurde die aus der Kantenerkennung resultierende Vergrößerung der Kernfläche durch Durchführung einer Erosion korrigiert, wobei an den Ränder der Kernflächen die überschüssigen Pixel entfernt wurden.

3.4.3.4 Kombination von Kernmaske und Immunfluoreszenz

Um die bei der Quantifizierung erhaltenen Ergebnisse verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, wurden bei der Verarbeitung der Immunfluoreszenzbilder alle Arbeitsschritte unter der Voraussetzung durchgeführt, dass die Signalintensität nicht unkontrolliert verändert wurden (z. B. durch Veränderung der Expositionszeit).

Laden der Immunfluoreszenzbilder

Die parallel zur DAPI-Fluoreszenz aufgenommenen Bilder der zu untersuchenden Immunfluoreszenz wurden in einen Stapel geladen.

Korrektur der Expositionszeit

Die schwankende Effizienz der Antikörperbindung während der Immundetektion führten zu einer von Probe zu Probe unterschiedlich starken Intensität der Fluoreszenz. Während der Bildaufnahme musste in einigen Fällen die Expositionszeit verringert werden, da die Bilder sonst überstrahlt worden wären. Zwischen aufgenommener Fluoreszenzintensität und Expositionszeit bestand ein linearer Zusammenhang. Bilderserien, die mit erhöhter Expositionszeit aufgenommen wurden, konnten daher auf die niedrigere Expositionszeit anderer Serien normiert werden. Dazu wurden die Helligkeitswerte der Bilderserie mit höherer Expositionszeit mit dem Verhältnis aus normaler und höherer Expositionszeit multipliziert.

Z-Projektion/Median

Zur Ausgleichung von Inhomogenitäten, die durch das Aufnahmesystem in die Bilder gelangten, wurde ein Ausgleichsbild generiert.

Normierung des Stapels

Die aufnahmebedingten Inhomogenitäten wurden durch Division der Stapelbilder mit dem Ausgleichsbild herausgerechnet.

Bestimmung der Hintergrundwerte

Da zwischen den einzelnen Bildern einer Serie Schwankungen in der Fluoreszenzintensität auftraten, wurde für jedes Bild ein Hintergrundwert bestimmt. Als Hintergrundwert wurde dabei der kleinste Helligkeitswert des jeweiligen Bildes festgelegt.

Erzeugung der kombinierten Bilder

Der Bildstapel mit den Kernmasken wurde mit dem Bildstapel der Immunfluoreszenz mittels verknüpft. Dazu wurde jeder Pixelwert des Maskenbildes mit dem Fluoreszenzbild verglichen und der geringere von beiden Werten in ein neues Bild übernommen. Da

jeder Zellkern im Maskenbild den Wert 255 und der Hintergrund den Wert 0 besaß, entstand ein Bildstapel, der im Bereich der Zellkerne die Fluoreszenzsignale der Zellkerne und im Hintergrundbereich den Wert 0 enthielt.

3.4.3.5 Bestimmung des Immunfluoreszenzsignals jedes Zellkerns

Objekterkennung

Die Objekterkennung wurde an dem Bildstapel durchgeführt, der die Immunfluoreszenz nur im Bereich der Zellkerne enthielt. Es wurde ein Schwellwert von 1-255 benutzt, da mit diesem Bereich die Zellkerne vom Hintergrundwert 0 getrennt werden konnten. Bei der Objekterkennung wurden für jeden Zellkern die Kernfläche in Quadratpixel und die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellkerne bestimmt.

Hintergrundkorrektur

Um Schwankungen der Hintergrund-Fluoreszenz zwischen den einzelnen Bildern einer Serie auszugleichen, wurde von der mittleren Fluoreszenzintensität jedes Zellkerns der im Vorhergehenden bestimmte Hintergrundwert abgezogen.

Berechnung des Intensitätsintegrals

Zur Berechnung der Gesamtintensität der Fluoreszenz in jedem Zellkern wurde die Kernfläche mit der um den Hintergrundwert korrigierten mittleren Fluoreszenzintensität multipliziert.

3.4.4 Bestimmung des Differenzierungsmusters

Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 10–20 Zellen/cm² im Kulturmedium ausgesät, das 20 % FCS enthielt. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht und 14 Tage nach der Aussaat eine Morphologiefärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten mit MAY-GRÜN WALD-Lösung überschichtet, 5 Minuten später das gleiche Volumen an Wasser hinzugegeben und nach weiteren 5 Minuten mit Wasser gespült. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten in GIEMSA-Lösung gefärbt (1:10 v/v in Sörensen-Puffer, siehe Tabelle A.22). Nach erneuter Spülung mit Wasser wurden die Zellen mit Coomassie-Farblösung überschichtet und nach 40 Sekunden mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und anschließend drei Mal mit viel Wasser gespült.

Die Auswertung erfolgte mit einer Stereolupe in Anlehnung an Bayreuther u. a. (1988). Die Klassifizierung der einzelnen Differenzierungsstadien wurde entsprechend Abbildung 3.2 durchgeführt. Schnell proliferierende MF I oder MF II wurden gezählt, wenn sie Kolonien aus mehr als 50 Tochterzellen bildeten. Langsam proliferierenden MF III wurden gezählt, wenn sie Kolonien mehr als 3 Tochterzellen bildeten. Bei den nicht proliferierenden Zellen handelt es sich um PMF in den Stadien IV-VI, die immer mitgezählt wurden, sofern es sich nicht um nahe beieinander liegende Zellen handelte, die wahrscheinlich aus einer Zelle hervorgegangen und zeitgleich ausdifferenziert waren.

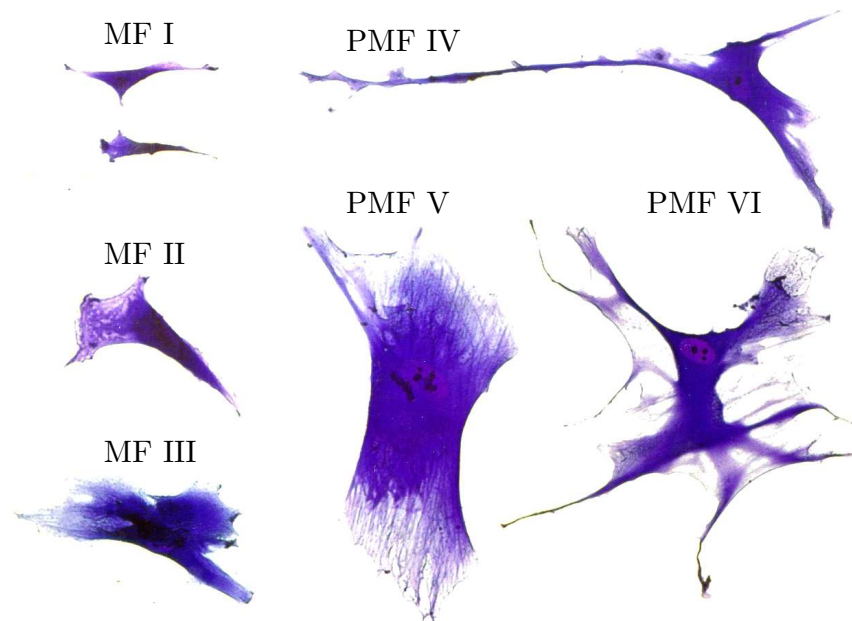


Abbildung 3.2: Differenzierungsstadien der AG 1522 Fibroblasten und ihre Klassifizierung in mitotische (MF I–III) und postmitotische (PMF IV–VI) Stadien. Fotografien aus Fournier u. a. (1998)

3.4.5 Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität

Die Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 10–20 Zellen/cm² ausgesät. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht und 14 Tage nach der Aussaat die Aktivität der β -Galaktosidase durch eine Enzym-Substrat Farbreaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten mit Formaldehyd-Lösung (3,6 % in PBS^{w/o}) fixiert und danach drei Mal mit Wasser gespült. Anschließend wurden die Kulturgefäße mit einer Substratlösung (XGal) überschichtet und für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Wasser gespült, an der Luft getrocknet und die Aktivität der β -Galaktosidase mikroskopisch aus der Menge an gebildetem blauem Präzipitat (5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol) beurteilt.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Übergang normaler Vorhautfibroblasten in einen irreversiblen Zellzyklusarrest, der auch als replikative Seneszenz bezeichnet wird untersucht. Dazu wurden Zellkulturen mit mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen bzw. 250 kV Röntgenstrahlen bestrahlt und in Langzeitkulturen über mehrere Monate kultiviert. Dazu wurde neben der Analyse der Zellzyklus-Verteilung die Expression von Zellzyklusinhibitoren herangezogen, die auch bei der ohne Bestrahlung auftretenden zellulären Seneszenz am Ende der Lebensspanne von Fibroblasten eine Rolle spielen. Begleitend wurde die Entwicklung des Differenzierungsstatus im Laufe der Kultivierung anhand morphologischer Kriterien untersucht. Der Ablauf der dazu durchgeführten Experimente wird in Abbildung 3.1, Seite 28 skizziert.

Mit zunehmendem zellulären Alter kommt es bei unbestrahlten Fibroblasten zu einer sequentiellen Differenzierung, die nach dem Durchlaufen abgegrenzter Stadien mit dem Verlust ihrer Teilungsfähigkeit endet und als terminale Differenzierung bezeichnet wird. Demgegenüber wird der Verlust der Teilungsfähigkeit, der eine Voraussetzung für den Übergang in die postmitotischen Stadien der Differenzierung ist, als replikative Seneszenz und die Gesamtheit der zeitgleich oder in Folge auftretenden Veränderungen als zelluläre Seneszenz bezeichnet (Übersicht in Ben-Porath und Weinberg 2005). Sowohl bei terminaler Differenzierung als auch bei replikativer Seneszenz wurden charakteristische Veränderungen der Zellmorphologie, eine teilweise bis völlig reduzierte Reaktion auf Wachstumsfaktoren und damit ein irreversibler Verlust der Teilungsaktivität beobachtet (Übersicht in Goldstein 1990). Die terminale Differenzierung kann durch Bestrahlung vorzeitig hervorgerufen werden (Rodemann u. a. 1991; Herskind und Rodemann 2000), ihre Ausprägung ist dabei von der Strahlenqualität abhängig (Fournier u. a. 2001). Ein terminaler Zellzyklus-Arrest nach ionisierender Strahlung ist beschrieben, jedoch nur bis zu einer Zeit von 96h nach Bestrahlung (Di Leonardo u. a. 1994). Bisher nicht beschrieben ist der Übergang der weiter proliferierenden Zellen in die replikative Seneszenz. Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die strahleninduzierte vorzeitige Differenzierung mit den gleichen Mechanismen einher geht wie die zelluläre Seneszenz. Hierbei wurde die unterschiedliche Wirkung dicht und locker ionisierender Strahlenqualitäten qualitativ verglichen und über einen längeren Zeitraum nach Bestrahlung beobachtet.

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung unbestrahlter Fibroblasten gezeigt (Abschnitt 4.1) und im Anschluss daran das Auftreten von Merkmalen der terminalen Differenzierung und der replikativen Seneszenz nach Bestrahlung untersucht (Abschnitt 4.2).

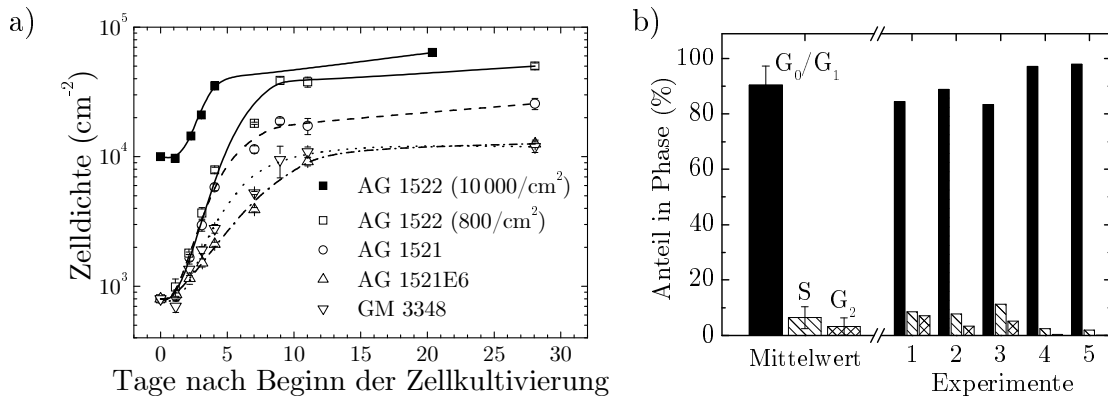


Abbildung 4.1: (a): Entwicklung der Zelldichte der AG 1522 Fibroblasten nach Aussaat in zwei unterschiedlichen Zelldichten (800 Zellen/ cm^2 und 10 000 Zellen/ cm^2) im Vergleich zu anderen Fibroblasten-Zelllinien. Fehlerbalken: Standardabweichung der Zellzahl dreier Proben. (b): Anteil Fibroblasten in der G_0/G_1 -, S- und G_2 -Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung in fünf verschiedenen Experimenten. Der Anteil Zellen in der G_0/G_1 -Phase lag im Durchschnitt bei etwa 90 %. Fehlerbalken: Standardabweichung der Experimente 1–5.

4.1 Charakterisierung der Fibroblasten

4.1.1 Voruntersuchungen für die Bestrahlungsexperimente

4.1.1.1 Synchronisierung der Zellen für die Bestrahlung

Die Bestrahlungsexperimente wurden mit Fibroblasten durchgeführt, die durch Kontakthinhibition in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus synchronisiert worden waren. Um einen Kultivierungsmodus zu ermitteln, der eine hohe Synchronisierung der Fibroblasten für die Bestrahlung ermöglicht, wurde die Entwicklung der Zelldichte über mehrere Tage nach der Zellaussaat gemessen. AG 1522 Fibroblasten wurden dazu in zwei Zelldichten, 800 Zellen/ cm^2 und 10 000 Zellen/ cm^2 ausgesät. Abbildung 4.1a zeigt die Entwicklung der Zelldichte im Zeitraum bis 28 Tage nach der Zellaussaat. Zum Vergleich wird die Entwicklung von drei anderen Fibroblasten-Zelllinien gezeigt.

Die maximale Zelldichte wurde bei der niedrigeren Zellaussaat nach etwa 6 Populationsverdopplungen erreicht, bei der höheren Zellaussaat nach etwa 2,7 Populationsverdopplungen. Um zum Zeitpunkt der Bestrahlung Kulturen mit einer hohen Zelldichte und zugleich auch einer möglichst niedrigen Anzahl an durchlaufenen Teilungen zu erhalten, wurden die AG 1522 Fibroblasten 14 Tage vor der Bestrahlung in einer Zelldichte von 10 000 Zellen/ cm^2 ausgesät.

Die Synchronität der so kultivierten Fibroblasten wurde direkt nach ihrer Bestrahlung kontrolliert. Abbildung 4.1b zeigt die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen. Der Anteil AG 1522 Fibroblasten in der G_0/G_1 -Phase schwankte zum Bestrahlungszeitpunkt zwischen 84 % und 98 % und lag im Durchschnitt bei etwa 90 %.

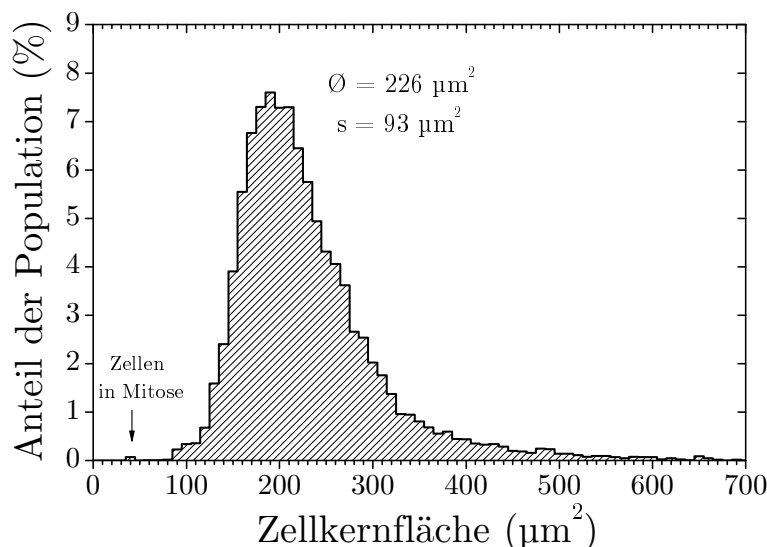


Abbildung 4.2: Verteilung der Zellkernflächen der AG 1522 Fibroblasten. Die Zellkernflächen wurden in Klassen im Abstand von je $10 \mu\text{m}^2$ eingeteilt. Die konfluenten Fibroblasten hatten eine mittlere Kernfläche von $226 \mu\text{m}^2$. Gemessen wurden 10035 Zellkerne.

4.1.1.2 Bestimmung der Zellkernfläche

Bei der Bestrahlung adhärenter Zellen mit Teilchenstrahlen ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle von einem Teilchen in ihrem Zellkern getroffen wird von der Teilchenfluenz und der Zellkernfläche abhängig und folgt einer POISSON-Statistik. Um die Trefferwahrscheinlichkeit für vorgegebene Teilchenfluenzen zu berechnen, wurde die Fläche konfluenter AG 1522 Fibroblasten gemessen und parallel dazu der Anteil mitotischer Zellen bestimmt. Abbildung 4.2 zeigt die Verteilung der Zellkernflächen. Die Zellen hatten zum Zeitpunkt der Messung eine Gesamtzahl an durchlaufenen Verdopplungen (kumulative Populationsverdopplungen, CPD) von 21,8. Dies entsprach etwa der CPD zum Zeitpunkt der Bestrahlung.

Die Zellen hatten bei einer Zelldichte von etwa $60\,000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ eine mittlere Kernfläche von $226 \mu\text{m}^2$ ($\pm 93 \mu\text{m}^2$ Standardabweichung); der Anteil an Zellen in der Mitose betrug maximal 0,036 %. In Folge der DNA-Kondensation hatten diese Zellen eine sehr kleine Zielfläche, die bei etwa $40 \mu\text{m}^2$ lag.

4.1.1.3 Einfluss der Kernfläche auf die Trefferwahrscheinlichkeit

Die Teilchendurchgänge sind bei Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen über die bestrahlte Fläche stochastisch verteilt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zellkern getroffen wird, hängt von seiner Fläche und der Anzahl an eingestrahlteten Teilchen ab. Bestrahlt man mehrere Zellen unter den gleichen Bedingungen, so steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen ungetroffen bleiben, mit der Anzahl der bestrahlten Zellen. Dies ist ein kritischer Faktor für die Durchführung von Langzeitexperimenten, da hier eine große Zellzahl be-

Tabelle 4.1: Durchschnittliche Anzahl an Teilchendurchgängen pro Zellkern und Anzahl an nicht getroffenen Zellen bei unterschiedlichen Fluenzen von Kohlenstoff-Ionen ($LET = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$). Die Grundlage der Berechnung bildete die tatsächliche Verteilung der Zellkernflächen in einer konfluenten Kultur von AG 1522 Fibroblasten. Zur Illustration ist in Spalte 4 die Anzahl an nicht getroffenen Zellen angegeben, die bei Bestrahlung einer für die durchgeführten Experimente typischen Größenordnung zu erwarten war.

Teilchenfluenz $F \left(\frac{10^6}{\text{cm}^2} \right)$	Dosis (Gy)	mittlere Zahl an Teilchendurchgängen $\lambda = A \cdot F$	Bei 10^6 bestrahlten Zellen nicht getroffene Zellen	Anteil nicht getroffener Zellen (%)
1,8	0,5	4,2	26 659	2,7
7,4	2	16,6	32	$3,2 \cdot 10^{-3}$
14,7	4	33,2	1	$1,0 \cdot 10^{-4}$
36,8	10	83,1	0	$1,5 \cdot 10^{-8}$

strahlt wird. Durch die lange Kultivierungsdauer können sich außerdem einzelne ungetroffene Zellen stärker als die getroffenen Zellen vermehren. Um eine Vorstellung von der Anzahl nicht getroffener Zellen bei den durchgeführten Experimenten zu bekommen, wurde eine Berechnung durchgeführt.

Aus der mittleren Zellkernfläche von $226 \mu\text{m}^2$ und den bei der Bestrahlung verwendeten Teilchenfluenzen wurde die zu erwartende mittlere Anzahl an Treffer pro Kern nach Gleichung 2.2 berechnet (siehe Tabelle 4.1). Bei einer Bestrahlung mit $1,8 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-2}$ Kohlenstoff-Ionen (0,5 Gy) mit einem linearen Energietransfer (LET) von $170 \text{ keV}/\mu\text{m}$ würde jeder Zellkern der konfluenten Kultur im Durchschnitt von etwa 4 Teilchen getroffen, bei $7,4 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-2}$ Kohlenstoff-Ionen (2 Gy) von etwa 16 Teilchen, bei $14,7 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-2}$ (4 Gy) von etwa 33 Teilchen und bei $36,8 \cdot 10^6 \text{ cm}^{-2}$ (10 Gy) von etwa 83 Teilchen.

Die Fläche der Zellkerne streute jedoch über einen Bereich von mehr als $100 \mu\text{m}^2$ um den Mittelwert und ein Teil der Zellen hatte aufgrund ihrer Mitose eine sehr kleine Trefferfläche ($40 \mu\text{m}^2$). Eine Berechnung des Anteils getroffener Zellen auf Basis der durchschnittlichen Zellkernfläche würde demnach für die Zellen, deren Kernfläche kleiner als der Mittelwert ist, eine Überschätzung der tatsächlichen Trefferzahl ergeben. Um die tatsächlich vorliegende Streuung der Kernflächen zu berücksichtigen, wurden die Zellkernflächen in Klassen im Abstand von je $10 \mu\text{m}^2$ eingeteilt und die Trefferwahrscheinlichkeit für den Anteil an Zellen in jeder Klasse berechnet. Tabelle 4.1 zeigt in den beiden rechten Spalten die aus der Faltung von Zellkernflächenverteilung und POISSON-Statistik resultierende Anzahl bzw. Anteil an nicht getroffenen Zellkernen bei der Bestrahlung einer konfluenten Zellkultur. Der Anteil nicht getroffener Zellen fällt mit steigender Dosis. Bei 0,5 Gy wurde der Anteil nicht getroffener Zellen überwiegend von den Zellen mit einer Kernfläche im Bereich des Mittelwerts gebildet. Bei 2 Gy, 4 Gy und 10 Gy wurde der Anteil nicht getroffener Zellen nahezu vollständig aus den Zellen gebildet die sich in der Mitose befanden.

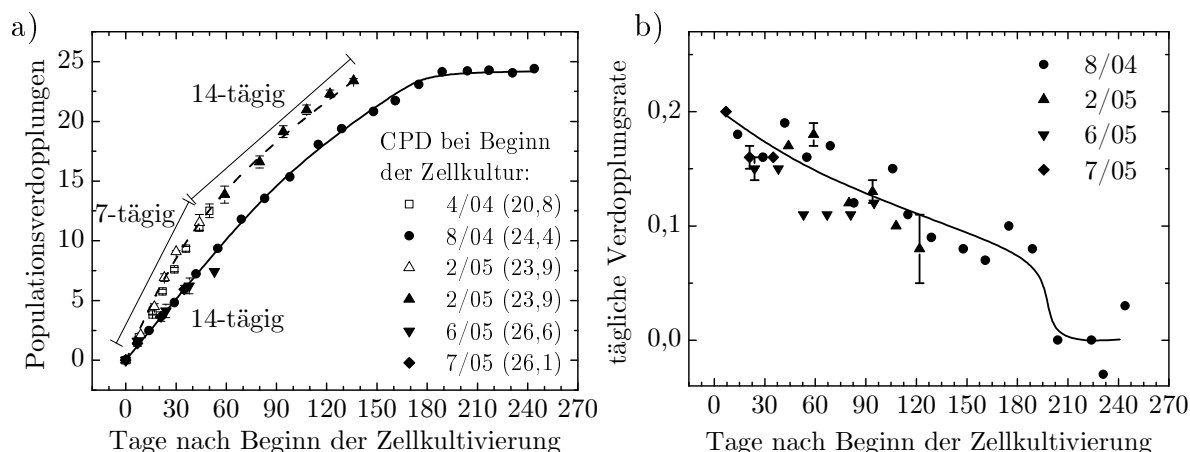


Abbildung 4.3: Zeitliche Entwicklung der Populationsverdopplungen der Kontrollzellen mehrerer Bestrahlungsexperimente. In Klammern ist die CPD der Kultur bei Beginn des Experiments angegeben, der zeitliche Abstand zwischen den Passagen wird durch ausgefüllte (14 Tage) und leere Symbole (7 Tage) wiedergegeben. **(a):** Bei 7-tägigem Abstand zwischen den Passagen nahm die Anzahl der Populationsverdopplungen stärker zu als bei 14-tägigem Abstand. Im Experiment „8/04“ wurden die Zellen über 244 Tage passagiert, wobei nach 190 Tagen und einer CPD von insgesamt 48 kein Wachstum der Population mehr zu beobachten war. **(b):** Entwicklung der Verdopplungsrate der Kontrollzellen bei einem Abstand von 14 Tagen zwischen den Passagen. Nach etwa 190 Tagen verdoppelte sich die Population nicht mehr. Fehlerbalken in beiden Graphen: Standardfehler von jeweils zwei Kontroll-Kulturen.

4.1.2 Langzeitentwicklung unbestrahlter Fibroblasten

4.1.2.1 Zusammenhang zwischen Verdopplungsrate und Dauer der Kultivierung

Das Alter einer Zellkultur kann durch die Summe der durchlaufenen Verdopplungen der Gesamtpopulation ausgedrückt werden (kumulative Populationsverdopplungen, CPD). Die CPD gibt dabei zwar keinen Aufschluss über das individuelle Alter einzelner Zellen in der Population, sie ist jedoch ein besserer Indikator für das Alter der Gesamtpopulation als die Anzahl der durchgeführten Passagen. Humane diploide Fibroblasten haben in Zellkultur eine begrenzte replikative Lebensspanne, daher ist ihre CPD begrenzt (Hayflick und Moorhead 1961). Abbildung 4.3a zeigt die Entwicklung der PD der Kontrollzellen mehrerer Bestrahlungsexperimente, bei denen die Zellen im Abstand von 7 bzw. 14 Tagen passagiert wurden. Bei 14-tägigem Abstand waren die Kontrollzellen bereits mehrere Tage konfluent, wodurch ihr Populationswachstum gebremst wurde. Die tägliche Verdopplungsrate war daher bei 7-tägigem Abstand größer als bei 14-tägigem Abstand (etwa 0,25 Verdopplungen/Tag gegenüber etwa 0,15 Verdopplungen/Tag).

Im Experiment „8/04“ wurden die Fibroblasten über 244 Tage regelmäßig passagiert, wobei die Population nach 190 Tagen und einer Gesamtzahl von etwa 48 Populationsverdopplungen (24,4+24) keine Proliferation mehr zeigte. Im Experiment „2/05“, das mit einem Passageabstand von 7 Tagen begonnen und nach 30 Tagen mit 14-tägigem Passageabstand weitergeführt wurde, entwickelte sich die Anzahl der Populationsverdopplungen

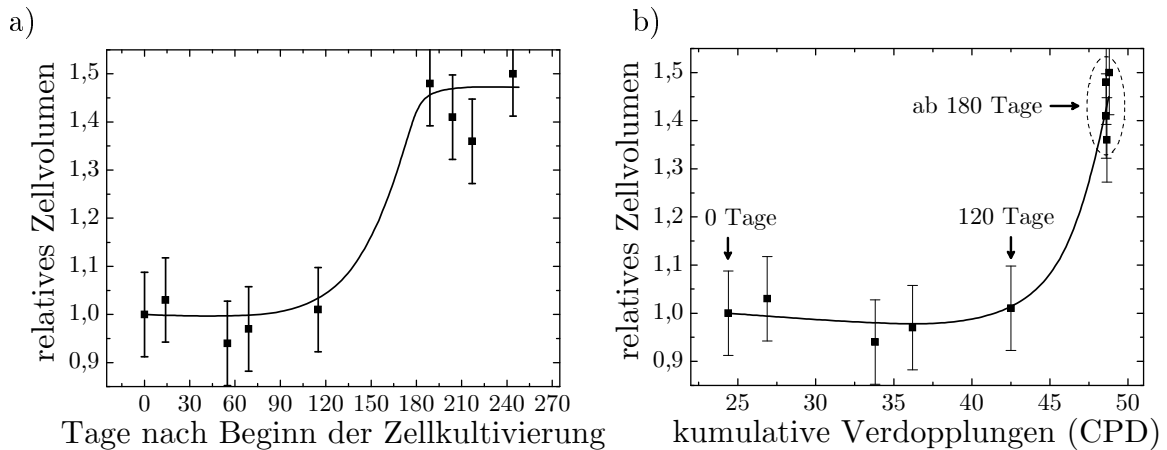


Abbildung 4.4: Das Zellvolumen der Kontrollzellen nahm mit Zunahme der Kultivierungsdauer **(a)** und des Alters der Population **(b)** zunächst nicht zu, sondern erhöhte sich erst beim Erreichen des Stillstands der Proliferation. Die Fehlerbalken geben die größte aufgetretene Standardabweichung eines Vorexperiments wieder, bei dem jeweils vier verschiedene Proben ausgewertet wurden, das aber nur bis zu einer CPD von 24 durchgeführt wurde. Sie sind zur Einschätzung des Messfehlers eingetragen, da bei dem gezeigten Experiment keine Mehrfachbestimmung möglich war.

ab diesem Zeitpunkt parallel zum Experiment „8/04“. Im Experiment „2/05“ wurde die Entwicklung der Zellen nur bis 136 Tage nach Beginn der Zellkultivierung beobachtet. Um zu untersuchen, ob die Zunahme der Verdopplungen gleichmäßig oder schwankend abläuft, wurde zu jeder Passage, die im Abstand von 14 Tagen durchgeführt wurde die durchschnittliche tägliche Verdopplungsrate berechnet. In Abbildung 4.3b ist diese tägliche Verdopplungsrate gegen die Dauer der Kultivierung aufgetragen. Die tägliche Verdopplungsrate der Fibroblastenpopulation ging im Laufe der Kultivierung gleichmäßig zurück, nahm jedoch zwischen 190 und 200 Tagen von einer täglichen Verdopplungsrate von 0,1 sehr schnell auf Null ab.

4.1.2.2 Abhängigkeit des Zellvolumens vom Alter der Zellkultur

Bei Fibroblasten ist mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz eine Zunahme des Zellvolumens beschrieben (Mitsui und Schneider 1976a). Um festzustellen, ob mit dem steigendem Alter der AG 1522 Fibroblasten eine Zunahme des Zellvolumens zu beobachten war, wurde das durchschnittliche Zellvolumen der Gesamtpopulation bestimmt und zum Alter der Zellkultur, d. h. der CPD, in Beziehung gesetzt. Da die Fibroblasten nach dem Trypsinieren in Suspension eine kugelförmige Gestalt annehmen, ließ sich ihr Volumen nach Messung des Zelldurchmessers berechnen. Die Untersuchungen wurden im Experiment „8/04“ durchgeführt und erstreckten sich vom Start der Kultivierung bei einer CPD von 24 bis zum Ende der Kultivierung nach 244 Tagen.

Abbildung 4.4 zeigt die Entwicklung des Zellvolumens in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (a) und CPD (b). Aufgetragen ist das relative Zellvolumen, bezogen

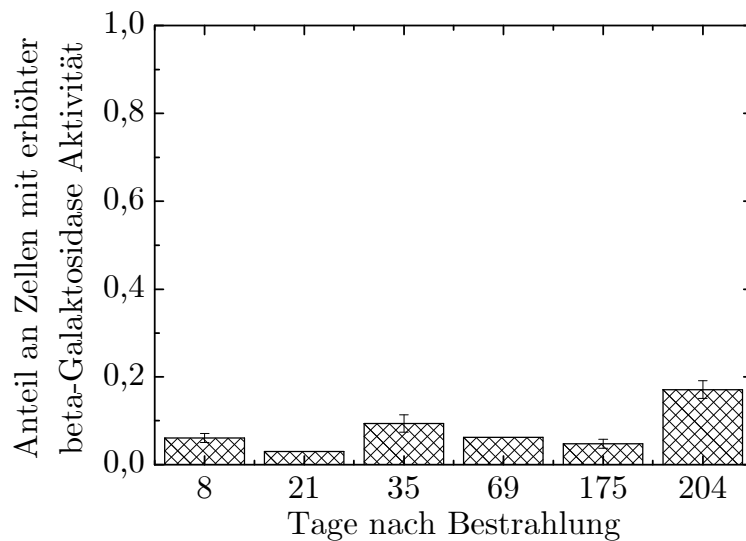


Abbildung 4.5: Entwicklung der β -Galaktosidase-Aktivität in unbestrahlten Kontrollzellen. Der Anteil an Zellen mit erhöhter Enzymaktivität machte über die gesamte Kultivierungsdauer nur einen geringen Teil der Gesamtpopulation aus. Nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz nach 204 Tagen hatte der Anteil an Zellen mit erhöhter Enzymaktivität zugenommen. Fehlerbalken: Standardabweichung aus zwei Proben. Daten aus Experiment „8/04“.

auf den Wert zu Beginn der Kultivierung. Die absoluten Zellvolumina lagen zwischen $4\,000$ und $6\,000\,\mu\text{m}^3$. Bis zu einer CPD von $42,5$ kam es zu keiner Veränderung des Zellvolumens. Erst zeitgleich mit dem Stillstand der Proliferation in der Gesamtpopulation, bei einer CPD von etwa 48 , wurde ein gegenüber den früheren Werten deutlich erhöhtes Zellvolumen beobachtet, das sich zwischen 190 und 244 Tagen nicht mehr stark veränderte.

4.1.2.3 Entwicklung der β -Galaktosidase-Aktivität

Als Indikator für die zelluläre Seneszenz einzelner Fibroblasten wird eine intrazelluläre Erhöhung der Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase beschrieben (Dimri u. a. 1995). Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden die Zellen zu den angegebenen Zeiten in niedriger Zelldichte ausgesät und die Enzymaktivität nach 14 Tagen durch eine Enzym-Substrat-Farbreaktion nachgewiesen. Aufgrund der niedrigen Zelldichte konnte bestimmt werden, ob die ausgesäten Zellen innerhalb der 14 Tage Kolonien gebildet hatten oder als Einzelzellen vorlagen. Eine sichtbare Färbung in den Zellkernen der Einzelzellen wurde als erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität gewertet.

Abbildung 4.5 zeigt, dass der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität im Zeitraum der Kultivierung nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation ausmachte. Die β -Galaktosidase-Aktivität nahm nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz nur bei einem kleinen Anteil der Population zu, der überwiegende Anteil der

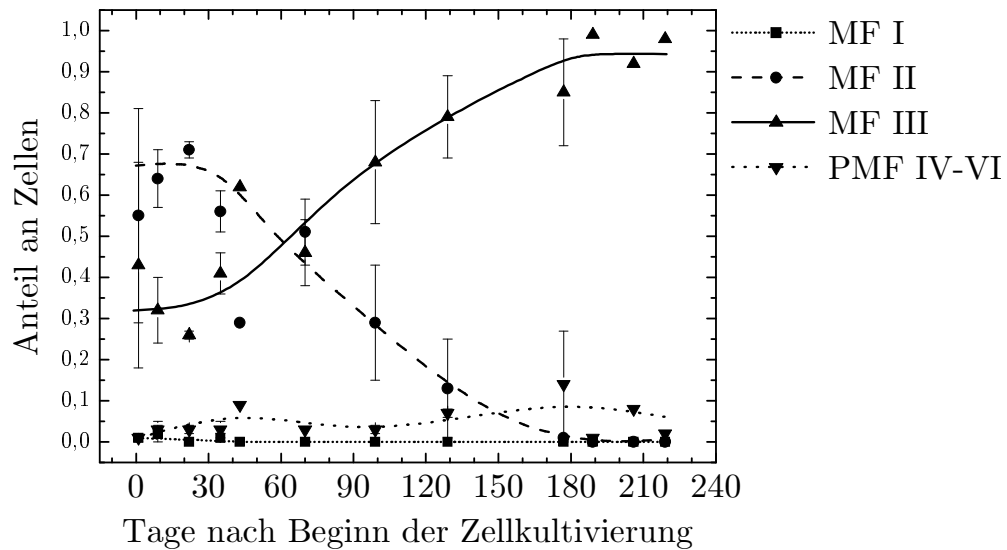


Abbildung 4.6: Entwicklung des Differenzierungsmusters in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Mit steigender Kultivierungsdauer nahm der Anteil an MF II-Fibroblasten ab und der Anteil an MF III-Fibroblasten nahm zu. Der Anteil an PMF veränderte sich nur geringfügig und nahm auch nach dem Stillstand der Proliferation der Zellen nicht zu. Daten aus den Experimenten „8/04“ und „2/05“, Fehlerbalken: Standardfehler aus zwei Experimenten.

Population zeigte trotz Teilungsstillstand keine erhöhte Enzymaktivität.

4.1.2.4 Entwicklung des Differenzierungsmusters

Bei Fibroblasten geht die zunehmende Anzahl durchlaufener Zellteilungen mit einer Veränderung des Differenzierungsmusters einher. Das Differenzierungsmuster lässt sich bestimmen, indem die Fibroblasten nach morphologischen Kriterien klassifiziert werden (Bayreuther u. a. 1988).

Abbildung 4.6 fasst die Ergebnisse der Experimente „8/04“ und „2/05“ zusammen und zeigt die Anteile der Differenzierungsstadien MF I–III (mitotische Fibroblasten) und PMF (postmitotische Fibroblasten) im Zeitraum von 0 bis 233 Tagen nach Beginn der Zellkultivierung. Angegeben sind die Zeitpunkte, zu denen die Zellen ausgesät wurden, der Zeitpunkt der Färbung lag 14 Tage danach. Zellen im Stadium MF I konnten während der gesamten Dauer des Experiments nur vereinzelt gefunden werden. Der überwiegende Anteil an Zellen (etwa 70 %) befand sich zu Beginn des Experiments im Stadium MF II, während etwa 30 % der Zellen im Stadium MF III und nur 1 % im Stadium PMF waren.

Das Differenzierungsmuster der Fibroblasten veränderte sich bis zum Stillstand der Proliferation kontinuierlich, blieb danach aber unverändert. Der Anteil an MF II nahm kontinuierlich ab, nach 180 Tagen waren keine Zellen mehr nachweisbar. Gleichzeitig nahm der Anteil an MF III zu und erreichte nach 180 Tagen mehr als 90 %. Der Anteil an PMF veränderte sich dagegen nur geringfügig und lag über den gesamten Beobach-

tungszeitraum unter 10 %.

4.1.2.5 Entwicklung der Proteinexpression

Der Verlust der Teilungsaktivität setzt eine Inhibition der Zellzyklusprogression voraus. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Fibroblasten nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befinden (Stein und Dulic 1995). Der Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus wird durch den G₁-Kontrollpunkt reguliert bei dem das Tumorsuppressorprotein p53 und die CDK-Inhibitoren p21^{CIP/WAF1} und p16^{INK4A} eine hemmende Rolle spielen (siehe Abschnitt 3.4.1).

Zur Untersuchung, ob die Inhibition der Proliferation von einer veränderten Expression der Proteine p53, p21 und p16 begleitet wurde, wurden bei jeder Passage die entsprechenden Proteine im *Western-Blot* analysiert. In Abbildung 4.7 wird die im *Western-Blot* beobachtete Entwicklung der Proteinexpression von p53, p21 und p16 zwischen dem Beginn der Zellkultur und dem Stillstand der Proliferation gezeigt.

Innerhalb den ersten 60 Tage nach Beginn des Experiments war die Akkumulation bzw. Expression von p53 und p21 zuerst zwei- bis dreifach gegenüber dem Anfangszeitpunkt erhöht. Die p53-Akkumulation ging danach zwar auf den Anfangswert zurück, nahm danach jedoch stetig auf das etwa Doppelte des Anfangswerts zu. Die p21-Expression ging ebenfalls auf den Anfangswert zurück, erhöhte sich jedoch ab 180 Tage auf das Vierfache des Anfangswerts. Die Expression von p16 stieg dagegen über die gesamte Experimentdauer nicht an, sie ging zwischen 40 und 60 Tagen auf das 0,2-fache des Anfangswerts zurück, stieg jedoch gegen Ende der Kultivierungsdauer wieder auf den Anfangswert.

4.1.2.6 Zusammenfassung: Entwicklung unbestrahlter Fibroblasten

Bei der Langzeitkultivierung der unbestrahlten AG 1522 Fibroblasten ging die Verdopplungsrate kontinuierlich zurück und es kam etwa 190 Tagen bei einer CPD von 48 zu einem Stillstand der Proliferation, der mit einer Vergrößerung des Zellvolumens und bei einem Teil der Population mit einer erhöhten Aktivität der β -Galaktosidase einher ging.

Parallel zum Rückgang der Proliferation nahm der Anteil an MF II Zellen stetig ab während der Anteil an MF III Zellen zunahm. Der Anteil an MF I Fibroblasten lag im Untersuchungszeitraum unter 5 % und der Anteil an postmitotischen Fibroblasten blieb unter 10 %. Nach dem Stillstand der Proliferation veränderte sich das Differenzierungsmuster im untersuchten Zeitraum nicht mehr.

Der Rückgang der Proliferation ging mit einer veränderten Proteinexpression einher. Die p53-Akkumulation nahm Anfangs auf das Doppelte des Anfangswerts zu, ging zwischen 30 und 60 Tagen auf den Anfangswert zurück und nahm danach stetig auf das Doppelte des Anfangswerts zu. Die p21-Expression nahm ebenfalls am Anfang der Kultivierung zu, ging danach von dreifach erhöhten Werten auf den Anfangswert zurück und stieg schließlich zeitgleich mit dem Stillstand der Proliferation auf das Vierfache des An-

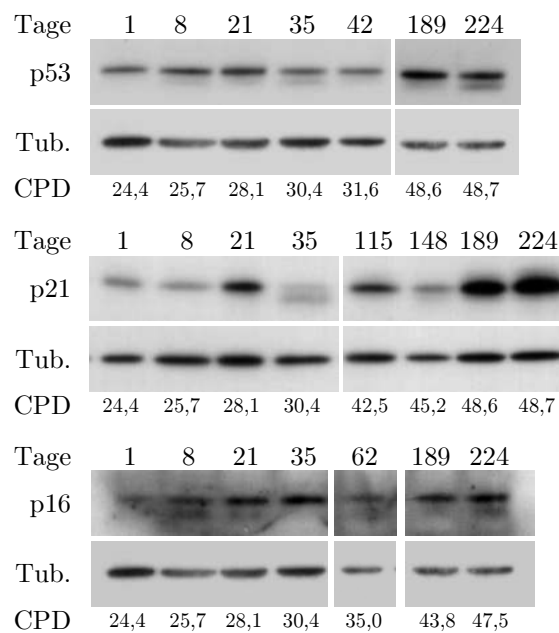
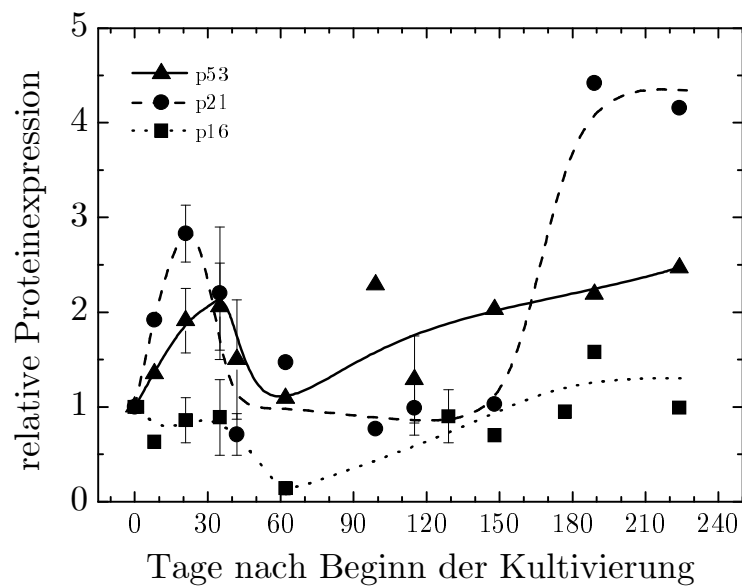


Abbildung 4.7: Relative Akkumulation bzw. Proteinexpression von p53, p21 und p16 im Zeitraum von 0 bis 240 Tagen in unbestrahlten Kontrollzellen. Die oben abgebildete Grafik zeigt die densitometrisch ermittelte relative Akkumulation bzw. Expression der Proteine, bezogen auf den Anfangszeitpunkt. Unten sind exemplarisch *Western-Blots* aus Experiment „8/04“ abgebildet, zu jedem Protein Ausschnitte aus dem selben Blot. Unter den untersuchten Proteinen ist jeweils Tubulin als Ladekontrolle abgebildet. Daten aus den Experimenten „8/04“, „2/05“, „6/05“ und „7/06“, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus drei Experimenten. Eine weitere Beschreibung der Abbildungen befindet sich im Abschnitt 4.1.2.5.

fangswerts. Die Expression von p16 blieb dagegen unverändert, sie ging sogar zwischen 30 und 120 Tagen auf Werte zurück, die deutlich unter dem Anfangswert lagen.

4.2 Langzeitentwicklung nach Bestrahlung

Zur Untersuchung der strahleninduzierten Veränderungen der Zellzyklusprogression, des Differenzierungsmusters und der Proteinexpression wurden Fibroblasten mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen (9,8 MeV/u, $LET = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$) und 250 kV Röntgenstrahlen bestrahlt. Schwerpunkt der Untersuchungen waren strahleninduzierte Veränderungen, die einerseits auf eine vorzeitige Differenzierung der Fibroblasten hindeuten und andererseits als Kennzeichen für Seneszenz diskutiert werden. Parallel zu den bestrahlten Zellen wurden schein-bestrahlte Kontrollzellen mitgeführt, die unter den gleichen Bedingungen wie die bestrahlten Zellen kultiviert wurden. Um dabei die der Bestrahlung folgende Langzeitentwicklung zu untersuchen, wurden die Fibroblasten über mehrere Monate nach der Exposition subkultiviert. Die verwendeten Dosen und Strahlenqualitäten hatten zur Folge, dass sich die bestrahlten Kulturen zu unterschiedlichen Anteilen aus stärker und schwächer geschädigten Zellen zusammensetzten. Während der Langzeitkultivierung wurde daher ein zunehmendes Ausscheiden der direkt bestrahlten Zellen und eine anteilmäßige Zunahme der Nachkommen der trotz Bestrahlung noch teilungsaktiven Zellen erwartet. Zur besseren Übersicht wurde die zeitliche Entwicklung der Fibroblasten deshalb in drei aufeinander folgende Abschnitte unterteilt: Die Entwicklung der direkt bestrahlten Zellen und das Aufkommen der ersten Nachkommen wird im ersten Teil beschrieben (Phase I, Abschnitt 4.2.1). Im zweiten Teil wird die weitere Entwicklung der Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen behandelt (Phase II, Abschnitt 4.2.2). Die Spätentwicklung dieser Nachkommen zeigt schließlich der letzte Teil (Phase III, Abschnitt 4.2.3).

4.2.1 Phase I: Bestrahlte Fibroblasten und ihre Nachkommen

Im folgenden ersten Teil wird die Entwicklung von Fibroblasten in dem Zeitraum gezeigt, in dem sich die Kulturen zu einem überwiegenden Anteil aus den ursprünglich bestrahlten Zellen zusammensetzten. In Abhängigkeit von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis nahm am Ende dieser Phase der Anteil an Nachkommen der noch teilungsaktiven Zellen zu, was im zweiten Teil gesondert behandelt wird (Abschnitt 4.2.2).

4.2.1.1 Inhibition der Zellzyklusprogression

Die Bestrahlung humaner Hautfibroblasten mit ionisierender Strahlung führt zu einer Inhibition der Zellzyklusprogression, die sich durch einen Stillstand der Proliferation äußert (Di Leonardo u. a. 1994; Nasonova u. a. 2004). Die Inhibition kann dauerhaft sein, nach einer transienten Inhibition kann es aber auch zu einem Wiedereintritt in den

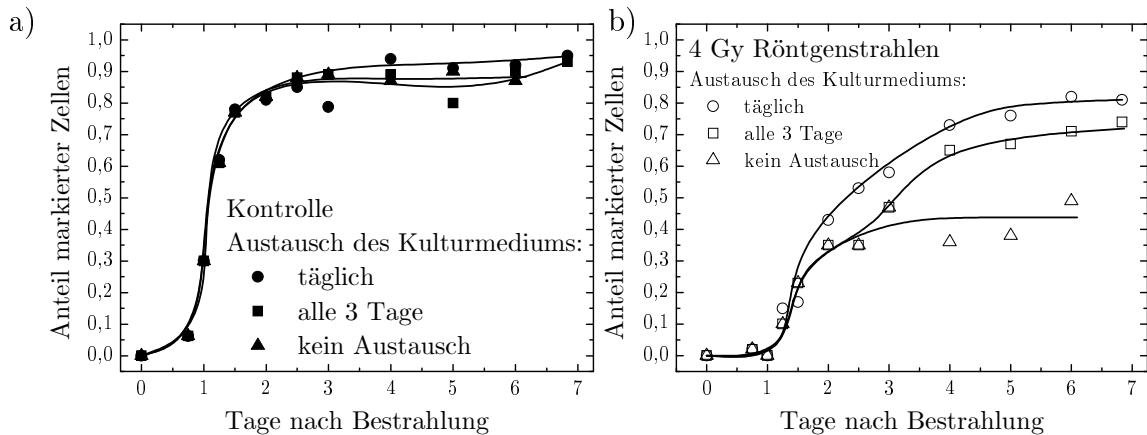


Abbildung 4.8: Abhängigkeit des BrdU-Markierungsindex vom Austausch des Zellkulturmediums. **(a):** Bei den unbestrahlten Zellen hatte der Austausch des Zellkulturmediums keinen Einfluss auf den maximal erreichten Anteil an markierten Zellen, der bei etwa 90 % lag. **(b):** Bei den bestrahlten Zellen hatte der Austausch des Kulturmediums einen großen Einfluss auf den BrdU-Markierungsindex: Ohne Austausch des Kulturmediums stabilisierte sich der Markierungsindex bei etwa 45 %. Bei täglichem Austausch stieg der Markierungsindex auf etwa 80 %, während ein einzelner Austausch nach 3 Tagen zu einem Markierungsindex von etwa 70 % führte.

Zellzyklus kommen. Der Anteil der nach Bestrahlung inhibierten Fibroblasten und die Dauer der Inhibition wurde mittels BrdU-Markierung und Durchflusszytometrie an in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus synchronisierten Zellen untersucht.

Abhängigkeit des Zellzyklusinhibition vom Austausch des Zellkulturmediums

Um den Anteil an Zellen zu bestimmen, bei dem die Zellzyklusprogression in Folge der Bestrahlung dauerhaft inhibiert ist, wurden der Übergang von der ersten G_0/G_1 -Phase in die S-Phase über einen Zeitraum von bis zu 7 Tagen nach Bestrahlung untersucht. Bei der regelmäßigen Kultivierung von Fibroblasten wird das Zellkulturmedium im Abstand von 3 Tagen gewechselt, um die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Da der Austausch des Kulturmediums demnach in den Untersuchungszeitraum der Bestrahlungsexperimente fiel, wurde in einem Vorexperiment die Abhängigkeit der Zellzyklusinhibition von der Häufigkeit des Mediaustauschs bei bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen bestimmt.

Abbildung 4.8 zeigt den Anteil BrdU-markierter Zellen in Abhängigkeit vom Austausch des Kulturmediums. In den unbestrahlten Kontrollzellen nahm der BrdU-Markierungsindex mit zunehmender Kultivierungszeit nach Bestrahlung zu. Nach 3 Tagen war ein Plateau mit etwa 90 % markierten Zellen erreicht. Das Maximum markierter Zellen veränderte sich beim Austausch des Kulturmediums nicht.

Nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlen war die Zunahme des BrdU-Markierungsindex im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen verzögert. Der Anteil markierter Zellen war ohne einen Austausch des Kulturmediums deutlich niedriger als in der unbestrahlten Population und betrug im Plateau nur 40 %. Nach einem einzelnen Austausch des Kul-

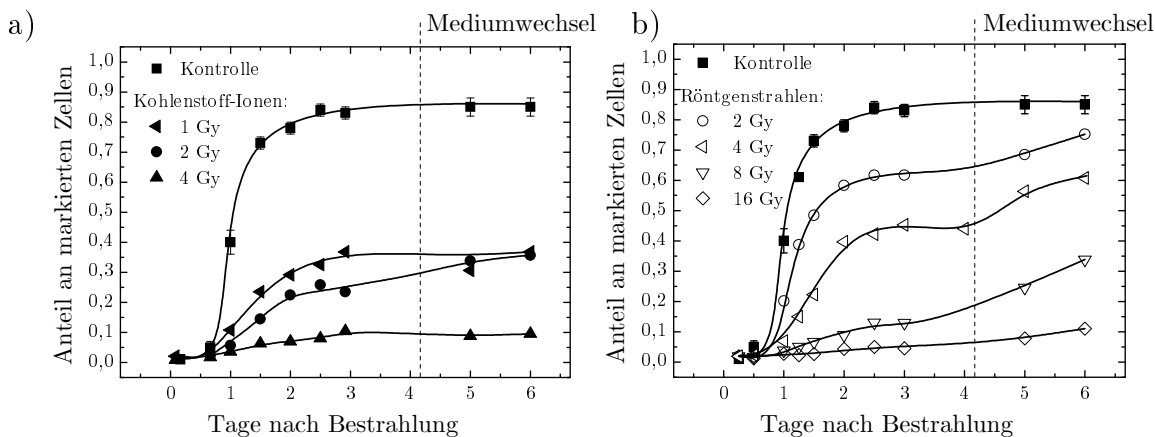


Abbildung 4.9: Der Anteil an BrdU-markierten Zellen nahm mit der Zeit zu, war nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (a) und Röntgenstrahlen (b) jedoch niedriger als in den Kontrollen. Nach 3 Tagen nahm der BrdU-Markierungsindex der bestrahlten Zellen nur noch langsam zu. Bei gleichen Dosen waren nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen weniger Zellen markiert als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Der Zeitpunkt des Mediumaustauschs wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Die Datenpunkte wurden durch Linien verbunden. Daten aus Experiment „8/02“ und „11/02“. Fehlerbalken: Standardfehler aus drei Kontroll-Kulturen.

turmediums nach 3 Tagen waren dagegen 70 % der Zellen markiert und ein täglicher Austausch des Kulturmediums führte dazu, dass bis zu 80 % der Zellen mit BrdU markiert waren. Um die weiteren Experimente unter standardisierten Bedingungen durchzuführen, wurde ein Austausch des Kulturmediums immer nach 3 Tagen durchgeführt.

Zellzyklusprogression nach Bestrahlung (kumulative BrdU-Markierung)

Abbildung 4.9 zeigt den Anteil an BrdU-markierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Der Markierungsindex war bei den bestrahlten Zellen dosisabhängig niedriger als bei den Kontrollen. Dabei zeigte sich, dass die Bestrahlung mit Iso-Dosen bei Kohlenstoff-Ionen zu einem geringeren Anteil an markierten Zellen führte als bei Röntgenstrahlen. Der Anteil an Zellen in der S-Phase nahm 3 Tage nach Bestrahlung nur noch langsam zu, nach dem Austausch des Kulturmediums kam es jedoch bei den mit Röntgenstrahlen und den mit 0,5 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen zu einer weiteren Zunahme des Markierungsindex.

Zellzyklusprogression nach Bestrahlung(Hoechst-BrdU-Quenching)

Da mit der Detektion BrdU-markierter Zellen nur die proliferierenden Zellen erfasst werden, ist mit dieser Methode nur eine indirekte Bestimmung des Anteils inhibierter Zellen möglich. Die Messung des Hoechst-BrdU-Quenchings im Durchflusszytometer erlaubt dagegen, den Anteil an Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase direkt zu bestimmen. Abbildung 4.10 zeigt den dabei ermittelten Anteil an Zellen, der sich zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung in der ersten G_0/G_1 -Phase befand, d.h. nach der Aussaat der Zellen nicht in den Zellzyklus eintrat.

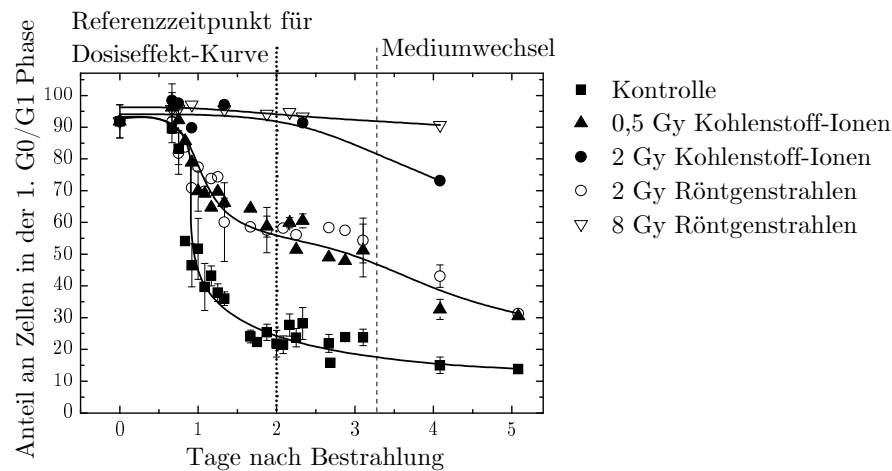


Abbildung 4.10: Der Anteil an Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase ging mit zunehmender Zeit zurück, blieb jedoch nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen höher als in der Kontrolle. Bei gleichen applizierten Dosen blieben nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen mehr Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase inhibiert als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Der Zeitpunkt des Mediumaustauschs wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Die Datenpunkte wurden durch Linien verbunden. Daten aus den Experimenten „8/02“, „8/04“ und „2/05“. Fehlerbalken: Standardfehler aus drei Experimenten.

Zu Beginn des Experiments waren über 90 % der Zellen in der G_0/G_1 -Phase synchronisiert. Einen Tag nach der Aussaat nahm der Anteil an Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase ab und stabilisierte sich bei den Kontrollen nach 2 Tagen bei etwa 20 %. Bei den bestrahlten Kulturen war der Anteil an Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase dosisabhängig höher als bei den Kontrollen.

Bei Bestrahlung mit Iso-Dosen befanden sich nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen mehr Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Zwischen 3 und 4 Tagen nach Bestrahlung wurde ein Austausch des Mediums bei allen Kulturen durchgeführt, worauf der Anteil an Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase in den bestrahlten Kulturen niedriger wurde. Die bei der flusszytometrischen Analyse und BrdU-Markierung (Abbildung 4.9) gemessenen Werte für den Anteil inhibierter Zellen zeigten eine gute Übereinstimmung.

Einfluss der Strahlenqualität auf die Zellzyklusinhibition

Um die Wirksamkeit von Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen bei der Zellzyklusinhibition von Fibroblasten zu quantifizieren, wurde der Anteil nach 48 Stunden inhibierter Zellen für beide verwendeten Strahlenqualitäten in Beziehung zur Dosis gesetzt.

In Abbildung 4.11 sind die Anteile an Zellen, die BrdU inkorporiert hatten bzw. sich noch in der ersten G_0/G_1 -Phase befanden gegen die Strahlendosis für die zwei im Experiment verwendeten Strahlenqualitäten aufgetragen. Der Einfluss auf den BrdU-Markierungsindex und den G_0/G_1 -Anteil war nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen

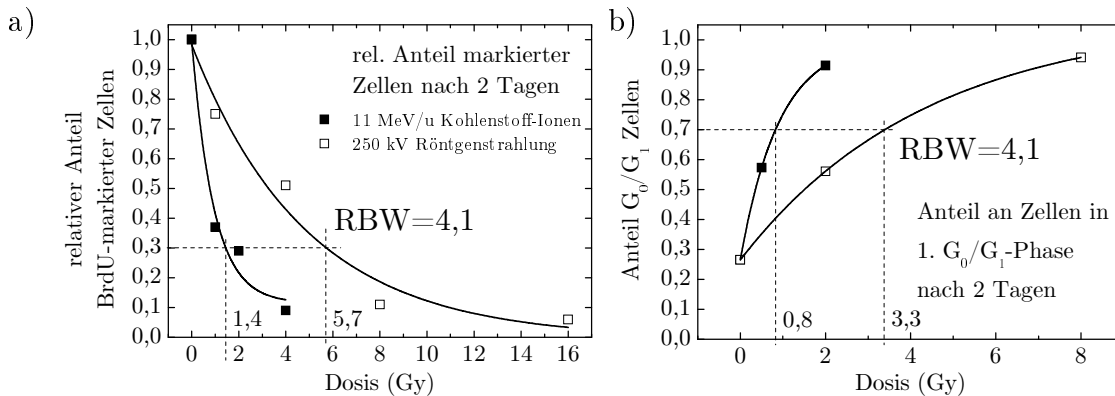


Abbildung 4.11: Abhängigkeit der Zellzyklusinhibition von der Strahlendosis und -qualität, 2 Tage nach der Bestrahlung. **(a):** Der mittels BrdU-Markierung bestimmte Anteil an BrdU-markierten, d. h. proliferierenden Zellen verringerte sich mit steigender Dosis. **(b):** Der mittels Hoechst-BrdU-Quenching ermittelte Anteil an Zellen, die in der ersten G_0/G_1 -Phase inhibiert waren, erhöhte sich mit steigender Dosis. Die gestrichelten Linien zeigen die für 30 % markierte Zellen bzw. 70 % G_0/G_1 -Zellen benötigte Dosis an. Ihr Verhältnis ergibt die relative biologische Wirksamkeit. Beide Methoden zeigten, dass Kohlenstoff-Ionen bei der Inhibition der Zellen eine höhere Wirksamkeit hatten als Röntgenstrahlen.

größer als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Bei einem Anteil von 70 % inhibierten Fibroblasten betrug die relative biologische Wirksamkeit (RBW) für Kohlenstoff-Ionen etwa 4,1. Als Iso-Effekt wurde dabei der Anteil inhibierter Zellen nach 2 Gy bis 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bzw. 8 Gy bis 16 Gy Röntgenstrahlen gewählt, da die weiteren Experimente mit diesen Dosen durchgeführt wurden. Bei der Inhibition der Proliferation nach 2 Tagen waren die Kohlenstoff-Ionen demnach viermal wirksamer als Röntgenstrahlen.

Messung der späteren Zellzyklusinhibition mittels BrdU-Puls-Markierung

Die Untersuchung der Zellzyklusinhibition mittels kumulativer BrdU-Markierung oder Hoechst-BrdU-Quenching erforderte, dass die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen mit BrdU-haltigem Kulturmedium kultiviert wurden. Da Fibroblasten ihre Proliferation zunehmend einstellen, wenn sie über mehrere Tage in BrdU-haltigem Medium kultiviert werden (Berger 2001), konnten spätere Zeitpunkte nicht mit diesen Methoden untersucht werden. Der Anteil an proliferierenden Zellen wurde daher für spätere Zeitpunkte durch eine Puls-Markierung mit BrdU ermittelt. Dabei wurden die Zellen dünn ausgesät und nach 5 Tagen dem Kulturmedium BrdU zugegeben. Nach einer Stunde Kultivierung wurden die in dieser Zeit mit BrdU markierten Fibroblasten detektiert.

Abbildung 4.12 zeigt den relativen Anteil an BrdU-markierten Zellen 5 und 19 Tage nach Bestrahlung. Der Anteil an Zellen, die von der G_1 - in die S-Phase übertraten, war in den bestrahlten Kulturen geringer als in der Kontrolle und nahm mit steigender Dosis für beide Strahlenqualitäten ab. Ein Vergleich des früheren mit dem späteren Zeitpunkt zeigt, dass der Anteil markierter Zellen in den Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen nach 19 Tagen höher war als nach 5 Tagen, aber im Unterschied dazu in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen abgenommen hatte.

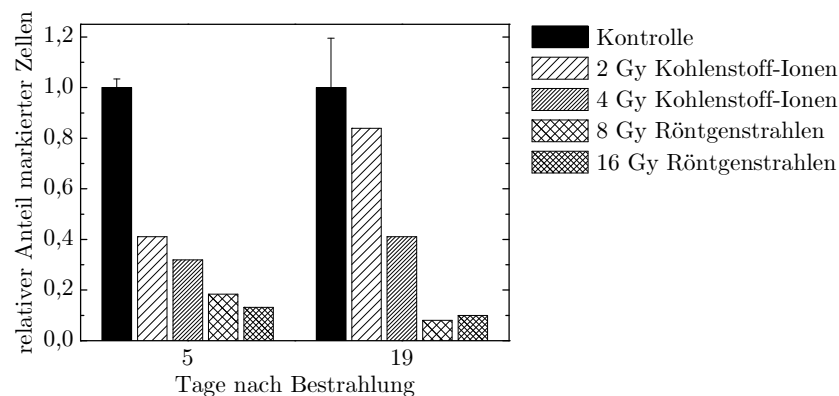


Abbildung 4.12: Relativer Anteil markierter Zellen, bezogen auf die Kontrollen (Kontroll-Wert: 9 % nach 5 Tagen und 30 % nach 19 Tagen), nach einstündiger Kultivierung mit BrdU. Zwischen 5 und 19 Tagen nach Bestrahlung zeigte sich ein dosisabhängig verringerter Anteil BrdU-markierter Zellen. In den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen nahm der Anteil markierter Zellen zwischen 5 und 19 Tagen zu. In den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen proliferierten dagegen weniger Zellen als nach 5 Tagen. Daten aus Experiment „2/05“ und „6/05“, Fehlerbalken: Standardabweichung zweier Kontroll-Kulturen.

Zusammenfassung: Zellzyklusprogression nach Bestrahlung

Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen führte bei den Fibroblasten zu einer dosisabhängigen Inhibition der Zellzyklusprogression. Die inhibierten Zellen traten nicht in die S-Phase ein und befanden sich in der ersten G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus.

Bis zu 5 Tage nach Bestrahlung war der Anteil inhibierter Zellen LET-abhängig erhöht. Kohlenstoff-Ionen waren in Bezug auf den Anteil inhibierter Zellen fast viermal so wirksam wie Röntgenstrahlen. Nach 5 Tagen und noch deutlicher nach 19 Tagen hatte sich diese LET-Abhängigkeit umgekehrt, nach Bestrahlung mit Kohlenstoff waren nun weniger Zellen inhibiert als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen.

4.2.1.2 Entwicklung der Proliferation nach Bestrahlung

Die strahleninduzierte Veränderung der proliferativen Kapazität von Fibroblasten lässt sich an der Entwicklung der Zellzahl zwischen zwei Passagen ablesen. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Passagen wurde aus den in Abschnitt 4.1.2.1 beschriebenen Gründen variiert und betrug 7 bzw. 14 Tage.

Abbildung 4.13 zeigt die Entwicklung der Anzahl an Populationsverdopplungen (PD) zwischen 9 und 30 Tagen nach Bestrahlung und die Verdopplungsrate am Anfang und Ende dieses Zeitraums. Abgebildet sind die Daten von zwei Experimenten bei denen die Zellen im Abstand von entweder 7 oder 14 Tagen passagiert wurden.

Bei den im Abstand von 7 Tagen passagierten Kulturen nahm die Zahl der PD bei der Kontrolle über mehrere Passagen gleichmäßig zu. Bei den bestrahlten Kulturen nahm sie dagegen nach 8 Tagen zunächst weniger stark zu als bei der Kontrolle, erreichte aber bei den mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten

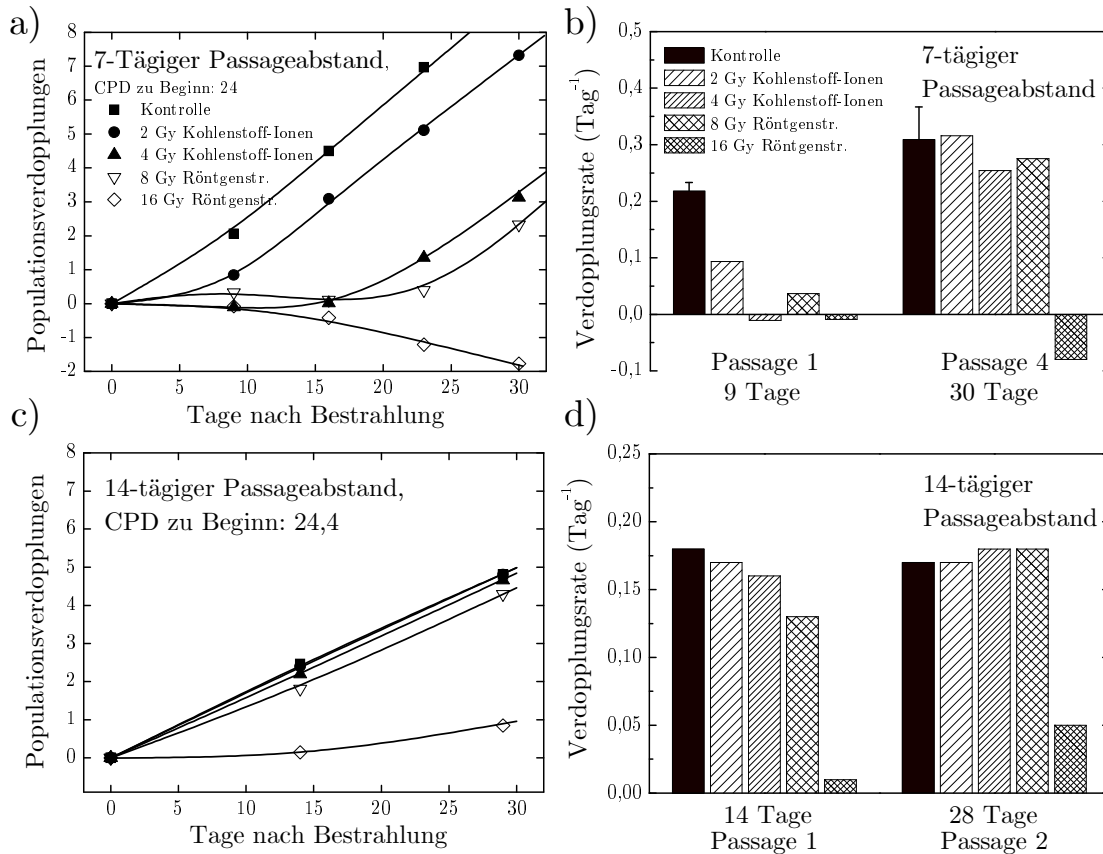


Abbildung 4.13: Entwicklung der Populationsverdopplungen nach Bestrahlung und Passagieren im Abstand von 7 bzw. 14 Tagen. **(a)** und **(b)**: Bei den im Abstand von 7 Tagen passagierten Kulturen war die Zunahme der Zahl der PD bei den bestrahlten Kulturen zunächst geringer als bei der Kontrolle, erreichte aber nach 30 Tagen in den bestrahlten Kulturen Kontrollniveau. Dabei nahm die Zahl der PD mit steigender Dosis zu späteren Zeiten zu. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen kam es dagegen zu einem Zellverlust und die Zahl der PD nahm rechnerisch ab. **(c)** und **(d)**: Bei den im Abstand von 14 Tagen passagierten Kulturen war die Zunahme der Zahl der PD bei den bestrahlten Kulturen nahezu so groß wie bei der Kontrolle, bei der mit 16 Gy bestrahlten Kultur nahm die Zahl der PD dagegen nur geringfügig zu. Der mit 14 Tagen größere zeitliche Abstand zwischen den Passagen bewirkte, dass sich die unterschiedlich starke Proliferation der bestrahlten Kulturen nicht deutlicher in der Entwicklung der Zahl der PD widerspiegelte. Daten aus Experiment „2/05“ (a, b) und „8/04“ (c, d), Fehlerbalken: Standardabweichung zweier Kontrollen.

Kulturen nach 30 Tagen wieder den Wert der Kontrolle, wobei die Zunahme mit steigender Dosis zu späteren Zeiten auftrat. Der Wiederanstieg der Proliferationsrate trat nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen deutlich früher auf als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur reduzierte sich die Zellzahl von Passage zu Passage, aus diesem Zellverlust resultierte rechnerisch eine Abnahme der Zahl der PD (Abbildung 4.13a u. b). Bei den im Abstand von 14 Tagen passagierten Kulturen war die Zunahme der Zahl der PD bei den mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen nahezu so groß wie bei der Kontrolle. In diesen Kulturen konnten die Zellen zwischen zwei Passagen die im Kulturgefäß zur Verfügung stehende Wachstumsfläche komplett bewachsen. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur nahm die Zahl der PD nur geringfügig zu (siehe Abbildung 4.13c u. d).

4.2.1.3 Veränderungen des Differenzierungsmusters

Um zu untersuchen, ob die Bestrahlung der Fibroblasten und der dadurch ausgelöste Zellzyklusarrest zu einer Veränderung des Differenzierungsmusters führte, wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten ausgesät und 14 Tage später fixiert und gefärbt. Nach einer Beurteilung ihrer Morphologie wurde der Anteil an Zellen in den mitotischen Differenzierungsstadien MF I, II und III und den postmitotischen Stadien (PMF). Ergänzend zur Bestimmung des Differenzierungsmusters an fixierten Zellen wurde zusätzlich die Morphologie lebender Zellen im Mikroskop fotografisch dokumentiert.

Die Abbildungen 4.14a-c zeigen den Anteil an Fibroblasten im Stadium MF II, MF III und PMF in den ersten 35 Tagen nach Bestrahlung. Der Anteil an MF II-Fibroblasten war nach 9 Tagen in den bestrahlten Kulturen gegenüber der Kontrolle dosisabhängig niedriger. Nach 22 und 35 Tagen hatte der MF II-Anteil in den ursprünglich bestrahlten Kulturen wieder zugenommen, wobei die zum früheren Zeitpunkt beobachtete Dosisabhängigkeit nicht mehr eindeutig war (Abbildung 4.14a). In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur blieb der MF II-Anteil dagegen dauerhaft deutlich unter dem der Kontrolle.

Der Anteil an MF III-Fibroblasten entwickelte sich umgekehrt zum MF II-Anteil und war gegenüber der Kontrolle nach 9 Tagen dosisabhängig erhöht (Abbildung 4.14b). Am darauf folgenden Zeitpunkt nach 22 Tagen war der MF III-Anteil in den ursprünglich bestrahlten Kulturen zurückgegangen und unterschied sich nach 35 Tagen nicht mehr von der Kontrolle. Eine Ausnahme war die mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Kultur, deren MF III-Anteil weiterhin deutlich erhöht war.

Der PMF-Anteil war nach 9 Tagen gegenüber der Kontrolle innerhalb der jeweiligen Strahlenqualität dosisabhängig erhöht (Abbildung 4.14c). Nach 22 und 35 Tagen hatte sich der PMF-Anteil in den ursprünglich bestrahlten Kulturen der Kontrolle angeglichen. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur war der Anteil an PMF dagegen nach 22 Tagen weiterhin deutlich erhöht und auch nach 35 Tagen noch deutlich größer als in den anderen Kulturen.

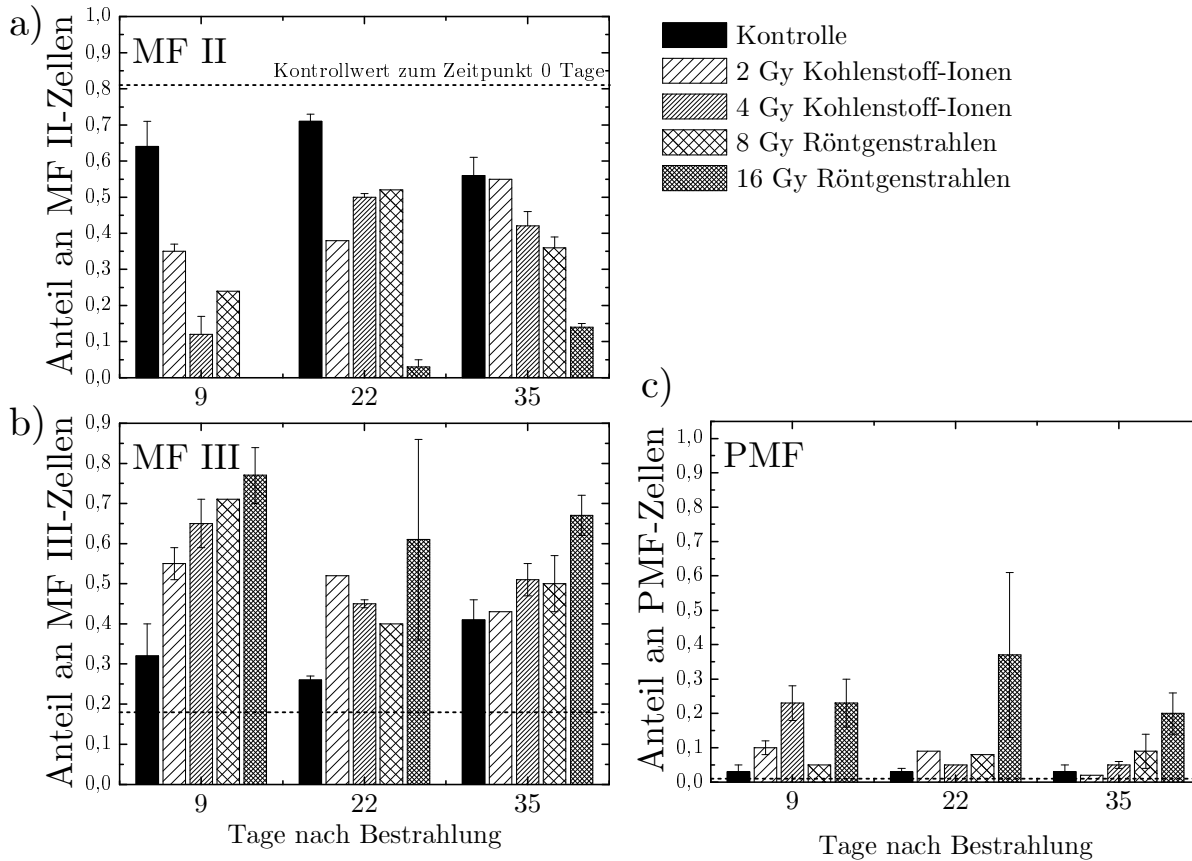


Abbildung 4.14: Differenzierungsmuster der AG 1522 Fibroblasten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Anteil des jeweiligen Stadiums (MF II, MF III, PMF) in der Kontrolle zu Beginn des Experiments. Das Differenzierungsmuster war nach 9 Tagen in den bestrahlten Kulturen zu späteren Stadien verschoben. Zwischen 22 und 35 Tagen nach der Bestrahlung näherte sich das Differenzierungsmuster der Kontrollen und der ursprünglich mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen einander an. In der ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Population war die Differenzierung in postmitotische Stadien deutlicher als in den anderen Populationen. Fehlerbalken: Standardabweichung der Experimente „8/04“ und „2/05“.

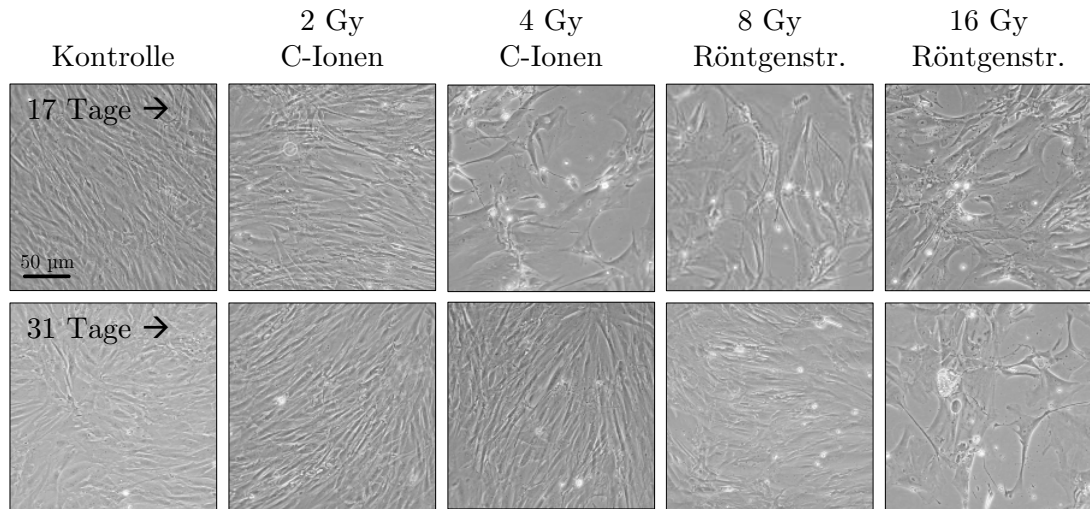


Abbildung 4.15: Zellmorphologie unfixierter Zellen, im Phasenkontrastmikroskop fotografiert. **Obere Reihe:** 17 Tage nach Bestrahlung unterschied sich die Zellmorphologie der bestrahlten Zellen deutlich von den unbestrahlten Kontrollzellen. Die bestrahlten Zellen waren größer als die Kontrollzellen und wuchsen weniger dicht. Die Veränderung der Morphologie war mit steigender Dosis stärker ausgeprägt. **Untere Reihe:** Nach 31 Tagen waren keine deutlichen Unterschiede mehr zwischen der Kontrolle und den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten zu sehen. In der mit 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur waren noch vereinzelt große Zellen vorhanden, die mit 16 Gy bestrahlten Kultur enthielt nur große und gestreckte Zellen.

Die Entwicklung des Differenzierungsmusters konnte auch am Erscheinungsbild der unfixierten Zellen nachvollzogen werden (Abbildung 4.15). Nach 17 Tagen befanden sich in den bestrahlten Kulturen große und unregelmäßig verzweigte Zellen, die sich von der Kontrolle unterschieden und deren Anteil sich mit der Dosis erhöhte. Zum späteren Zeitpunkt nach 31 Tagen unterschieden sich nur noch die mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen deutlich von der Kontrolle, die mit 2 Gy bzw. 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen bestanden überwiegend aus Zellen, deren Morphologie der Kontrolle entsprach.

Zusammengefasst zeigte sich bei den bestrahlten Kulturen zwischen 9 und 35 Tagen nach Bestrahlung zunächst eine Verschiebung des Differenzierungsmusters zu höheren Differenzierungsstadien. Dabei veränderte sich das Verhältnis der Wirksamkeit von Röntgen- und Kohlenstoff-Strahlung mit fortschreitender Kultivierung. Das Differenzierungsmuster der bestrahlten Kulturen glich jedoch in der darauf folgenden Zeit in den mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen der Kontrolle. In der mit 16 Gy bestrahlten Kultur kam es dagegen zu einer gegenüber der Kontrolle und den anderen bestrahlten Kulturen starken Erhöhung des PMF-Anteils.

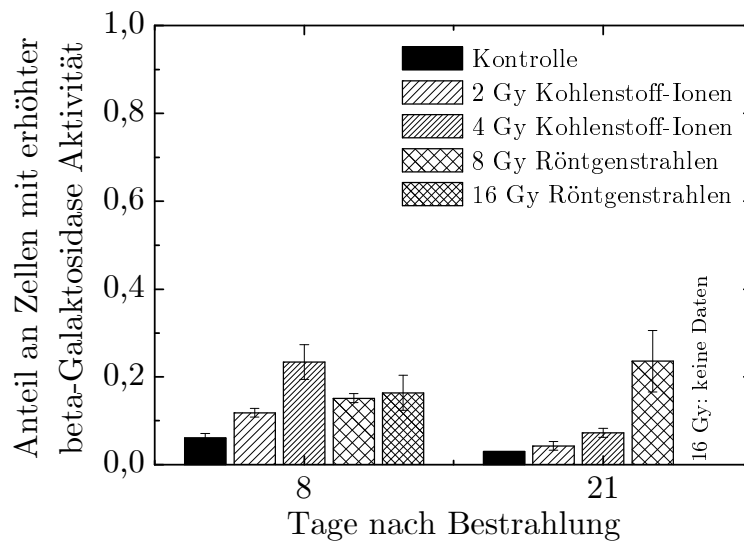


Abbildung 4.16: Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase war in den ursprünglich bestrahlten Populationen zunächst größer als in der Kontrolle. Nach 21 Tagen war enthalten nur noch die ursprünglich mit 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Population einen erhöhten Anteil. Fehlerbalken: Standardabweichung aus zwei Proben. Daten aus Experiment „8/04“.

4.2.1.4 Entwicklung der β -Galaktosidase-Aktivität

Abbildung 4.16 zeigt den Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität die 8 und 21 Tage nach der Bestrahlung ausgesät und 14 Tage später analysiert wurden. Eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase wird als Merkmal für zelluläre Seneszenz diskutiert (Dimri u. a. 1995; Severino u. a. 2000). Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität war in den ursprünglich bestrahlten Populationen größer als in der Kontrolle, jedoch hatte ein großer Teil der Kontrolle und der bestrahlten Populationen keine erhöhte Enzymaktivität. Die Enzymaktivität nahm bei den Kontrollen und den mit ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen zwischen 8 und 21 Tagen ab, war aber bei der mit ursprünglich 8 Gy bestrahlten Population auch nach 21 Tagen noch erhöht.

4.2.1.5 Proteinexpression in der Gesamtpopulation nach Bestrahlung

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, kam es bei den bestrahlten Fibroblasten zu einer ausgeprägten Inhibition der Zellen in der ersten G_0/G_1 -Phase und einer gegenüber den Kontrollzellen verringerten Proliferationsaktivität (Abbildungen 4.11 und 4.13). Um zu untersuchen, welche Zellzyklusinhibitoren an der Inhibition der Zellzyklusprogression beteiligt sind, wurde die Expression von Proteinen untersucht, die in der Zellzykluskontrolle am G_0/G_1 -Kontrollpunkt und in der replikativen Seneszenz eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Abbildungen 4.17a-c zeigen die Akkumulation bzw. Proteinexpression von p53, p21 und p16 zwischen 0 und 35 Tagen nach Bestrahlung.

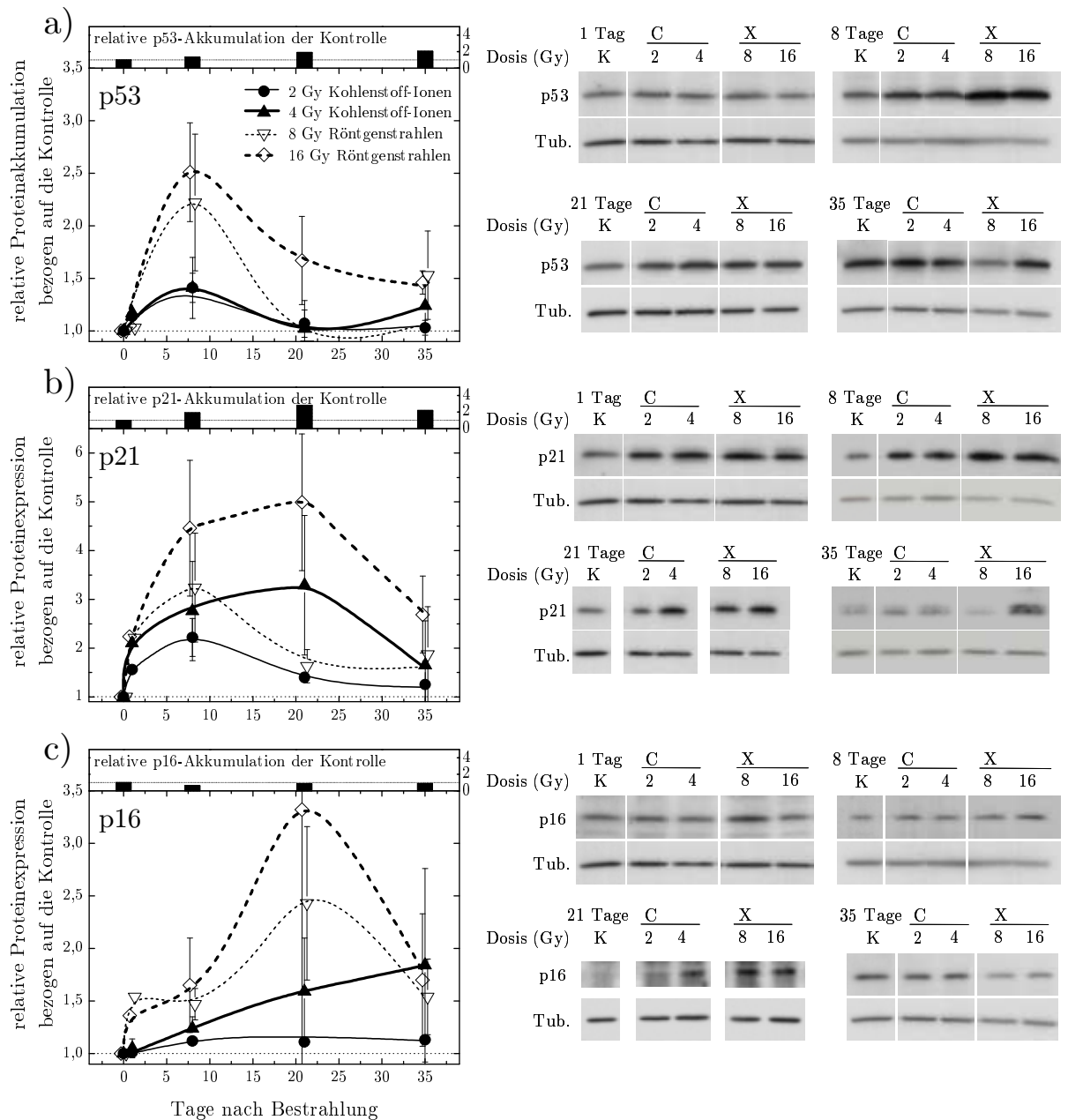


Abbildung 4.17: Relative Mengen von p53, p21 und p16 im Zeitraum von 0 bis 35 Tagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (C) und Röntgenstrahlen (X) im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle (K). Die links abgebildeten Grafiken zeigen die densitometrisch ermittelte relative Akkumulation bzw. Expression der Proteine. Rechts sind exemplarisch *Western-Blots* aus den dazugehörigen Experimenten abgebildet. Die Quantifizierung ist jeweils auf die Kontrolle zum selben Zeitpunkt bezogen, der Bezugspunkt wird durch die gepunktete Linie repräsentiert. Die Balken im oberen Teil der Abbildungen zeigen die relative Proteinexpression der Kontrolle bezogen auf den Anfangszeitpunkt. Die Daten stammen aus den Experimenten „8/04“, „2/05“, „6/05“ und „7/06“, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus diesen vier Experimenten. Eine Beschreibung der Abbildung befindet sich im Abschnitt 4.2.1.5.

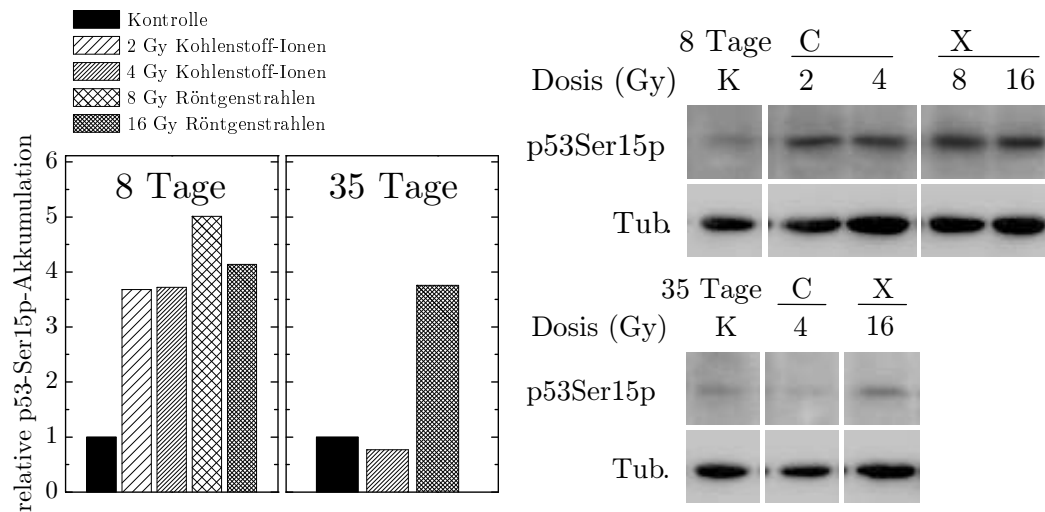


Abbildung 4.18: Akkumulation von Serin-15-phosphoryliertem p53, 8 und 35 Tage nach Bestrahlung. Die Histogramme zeigen die densitometrisch ermittelte relative Menge des Proteins, bezogen auf die Kontrolle. Rechts sind die zugrunde liegenden *Western-Blots* aus Experiment „8/04“ abgebildet. Eine weitere Beschreibung der Abbildung befindet sich im Abschnitt 4.2.1.5.

Akkumulation von p53

Die Menge an p53 war in den Kulturen, die mit Kohlenstoff-Ionen bzw. Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, zwischen 0 und 21 Tagen nach Bestrahlung gegenüber der Kontrolle erhöht. Die p53-Menge nahm innerhalb einer Strahlenqualität nicht dosisabhängig zu, jedoch fiel sie insgesamt bei den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen höher aus als bei den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen. Parallel dazu war die zelluläre Menge an Serin 15-phosphoryliertem p53 nach 8 Tagen in den bestrahlten Kulturen größer als in der Kontrollpopulation (Abbildung 4.18). Der darauf folgende Rückgang der p53-Menge war in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen nicht so deutlich wie in den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen. In der mit 16 Gy bestrahlten Kultur war die zelluläre Menge an Serin 15-phosphoryliertem p53 nach 35 Tagen deutlich höher als in der Kontrollpopulation und der ursprünglich mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Population.

Expression von p21

Die p21-Proteinexpression nahm zwischen dem Bestrahlungstag und 21 Tage danach in den bestrahlten Kulturen gegenüber der Kontrolle zu und ging danach bis 35 Tagen nach Bestrahlung wieder zurück. Die Zunahme war dosisabhängig und nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen ausgeprägter als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Die p21-Expression der mit höheren Dosen einer Strahlenqualität bestrahlten Zellen (4 Gy Kohlenstoff-Ionen bzw. 16 Gy Röntgenstrahlen) und deren Nachkommen blieb länger auf einem hohen Niveau als die Expression der mit niedrigeren Dosen bestrahlten Zellen (2 Gy Kohlenstoff-Ionen bzw. 8 Gy Röntgenstrahlen). Bei den mit 16 Gy Röntgenstrahlen

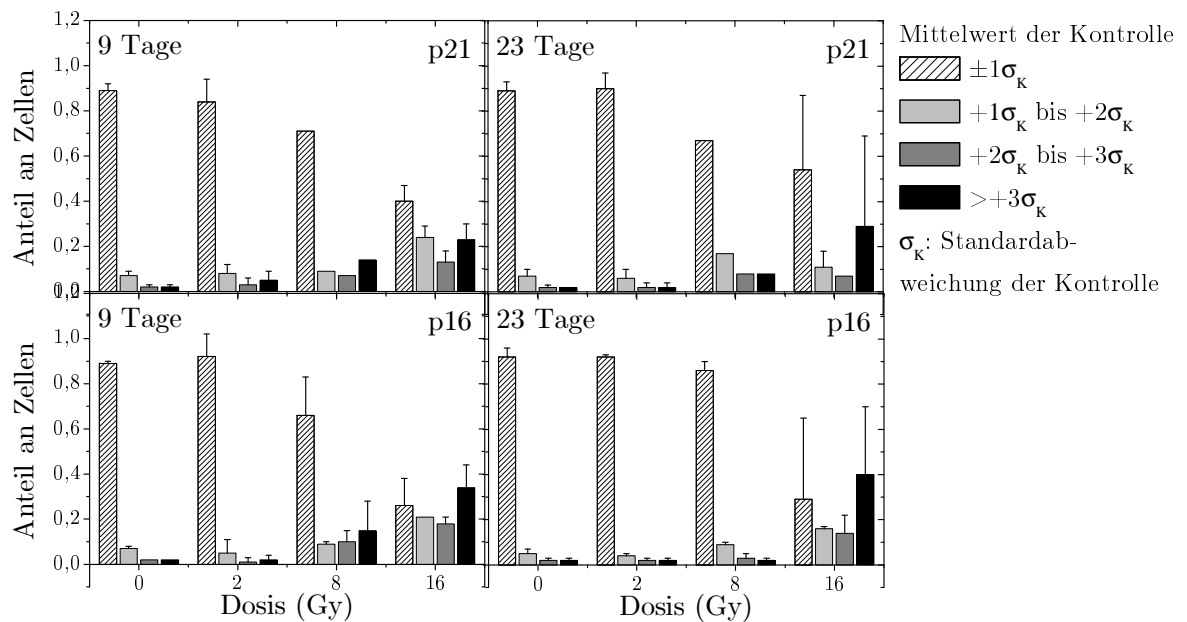


Abbildung 4.19: p21- und p16-Expression auf Einzelzellebene, 9 und 23 Tage nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Ergebnisse aus Experiment „2/06“ und „8/06“, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von jeweils drei Proben. Eine weitere Beschreibung der Grafiken befindet sich im Abschnitt 4.2.1.6.

bestrahlten Zellen blieb die p21-Expression auch nach 35 Tagen etwa 3-fach über dem Kontrollniveau, während sie bei den Nachkommen der übrigen bestrahlten Kulturen auf das Niveau der Kontrolle zurückging.

Expression von p16

Die Expression von p16 war zwischen dem Bestrahlungstag und 21 Tage danach in den mit 8 Gy und 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen erhöht, während sie bei den mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen relativ zur Kontrolle im Bereich des Messfehlers lagen, jedoch waren die Mittelwerte zu allen Zeitpunkten größer der Kontrollwert. Die Zunahme der p16-Expression trat bei den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen früher auf als bei den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen. Nach 35 Tagen lag die p16-Expression der Nachkommen aller bestrahlten Zellen relativ zu den Kontrollzellen im Bereich des Messfehlers, der Mittelwert der Proteinexpression war jedoch höher als bei der Kontrollpopulation.

Zusammenfassung: Proteinexpression in der Massenkultur

Die Menge an p53 und die Expression von p21 und p16 war in den bestrahlten Kulturen zwischen 0 und 35 Tagen gegenüber der Kontrolle erhöht. Die zelluläre Menge an Serin 15-phosphoryliertem p53 war in den bestrahlten Kulturen nach 8 Tagen ebenfalls größer als in der Kontrolle. Die Zunahme von p53 und p21 trat nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen zur gleichen Zeit auf und war von der Strahlen-

qualität unabhängig, die p21-Expression nahm dabei gleichzeitig mit der p53-Menge zu. Im weiteren Verlauf blieb die p21-Expression bei den mit höheren Dosen einer Strahlenqualität bestrahlten Zellen (4 Gy Kohlenstoff-Ionen bzw. 16 Gy Röntgenstrahlen) länger über dem Kontrollniveau als die p53-Menge. Im Unterschied dazu ging bei den Zellen, die mit niedrigeren Dosen bestrahlt worden waren, die p21-Expression gleichzeitig mit der p53-Akkumulation zurück.

Die Zunahme der p16-Proteinexpression war nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen früher zu beobachten und ausgeprägter als nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen. Die Erhöhung der p53-, p21- und p16-Expression war in den bestrahlten Kulturen und deren Nachkommen nicht dauerhaft, zwischen 21 und 35 Tagen nach der Bestrahlung kam es zu einem Rückgang der Akkumulation bzw. Expression dieser Proteine.

4.2.1.6 Proteinexpression in einzelnen Zellen nach Bestrahlung

Die im vorherigen Abschnitt gezeigte Entwicklung der Proteinexpression nach Bestrahlung wurde durch die Proteinanalyse von Zell-Lysaten ermittelt, für deren Herstellung jeweils alle Zellen einer Probe verwendet wurden. Die gemessene relative Proteinakkumulation bzw. -expression stellt daher lediglich einen Durchschnittswert der gesamten Zellkultur dar und gibt keine Auskunft über die Verteilung der Proteine in den einzelnen Zellen der Kultur. Erst durch die Entwicklung einer Methode, bei der adhärente Zellen *in-vitro* immunchemisch untersucht wurden, war eine Quantifizierung der Proteinexpression von p21 und p16 auch auf der Ebene einzelner Zellen möglich. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität des gebundenen Sekundärantikörpers für jedem Zellkern bestimmt und über die Zellkernfläche integriert. Das dabei erhaltene Intensitätsintegral entspricht der zellulären Proteinexpression von p21 bzw. p16.

Abbildung 4.19 zeigt die Verteilung der Proteinexpression von p21 und p16 innerhalb der Zellkulturen, 9 und 23 Tage nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Für den früheren Zeitpunkt wurden die Zellen direkt nach der Bestrahlung ausgesät, für den späteren Zeitpunkt einmal nach 14 Tagen passagiert. Für die Klassifizierung wurden der Mittelwert (\bar{x}_K) und die Standardabweichung (σ_K) der Proteinexpression in der Kontroll-Kultur als Bezugspunkte gewählt. Die Zellpopulation wurde entsprechend ihrer Proteinexpression in vier Klassen aufgeteilt:

- Klasse 1: Die Proteinexpression lag im Bereich einer Standardabweichung über und unter dem Mittelwert der Kontrolle.
- Klasse 2: Die Proteinexpression lag zwischen einer bis zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrolle.
- Klasse 3: Die Proteinexpression lag zwischen zwei und drei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrolle.
- Klasse 4: Die Proteinexpression lag über drei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrolle.

Expression von p21 auf Einzelzellebene

Der Anteil an Zellen, deren p21-Expression über der Kontrolle lag, nahm mit steigender Dosis zu (Abbildung 4.19a). In den mit 8 Gy und 16 Gy bestrahlten Kulturen war der Anteil an Zellen mit einer deutlich erhöhten Proteinexpression (d. h. mehr als drei Standardabweichungen über dem Kontroll-Durchschnitt) höher als der Anteil mit einer niedrigen Expression (d. h. zwischen 1–2 bzw. 2–3 Standardabweichungen über dem Kontroll-Durchschnitt). Der Anteil an Zellen mit einer gleichen p21-Expression wie die Kontrollzellen wurde zwar mit zunehmender Dosis niedriger, jedoch unterschieden sich in den mit 8 Gy und 16 Gy bestrahlten Kulturen noch mehr als 40 % der Zellen hinsichtlich ihrer p21-Expression nicht von den Kontrollzellen. Nach 23 Tagen war dieser Anteil in den bestrahlten Kulturen größer geworden (Abbildung 4.19b). In der mit 16 Gy bestrahlten Kultur nahm zusätzlich auch der Anteil an Zellen mit hoher p21-Expression zu, parallel dazu ging der Anteil an Zellen mit niedriger p21-Expression zurück.

Expression von p16 auf Einzelzellebene

Der Anteil an Zellen, deren p16-Expression über der Kontrolle lag, nahm ebenfalls mit steigender Dosis zu. In den mit 8 Gy und 16 Gy bestrahlten Kulturen war der Anteil an Zellen mit gesteigerter p16-Expression höher als der Anteil mit niedriger Expression. Der Anteil an Zellen, die sich hinsichtlich ihrer p16-Expression auf Kontrollniveau befanden, wurde in den bestrahlten Kulturen mit steigender Dosis zwar niedriger, betrug aber auch nach 16 Gy Röntgenstrahlen noch mehr als 20 %. Nach 23 Tagen war der Anteil an Zellen mit erhöhter p16-Expression in den mit 2 Gy und 8 Gy bestrahlten Kultur zurückgegangen. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur blieb der Anteil an Zellen mit stark erhöhter p16-Expression dagegen länger über dem der Kontrolle.

Zusammenhang zwischen p21- und p16-Expression und Differenzierungsstadium

Um zu untersuchen, ob die Expression von p21 und p16 mit dem Differenzierungsstadium korreliert, wurde für jedes Differenzierungsstadium die durchschnittliche Expression von p21- und p16 auf Einzelzellebene bestimmt (Abbildung 4.20). Die p21- und p16-Expression korrelierte bei den Zellen der Kontrollpopulation mit ihrem Differenzierungsstadium. Bei den mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen bestand diese Korrelation weiterhin, jedoch waren die Unterschiede in der p21- und p16-Expression zwischen den verschiedenen Differenzierungsstadien nicht mehr so groß. Die p21-Expression nahm nach Bestrahlung bei den Zellen im Stadium MF III gegenüber der Kontrollpopulation deutlich zu, bei den Zellen im Stadium PMF V war dies dagegen nicht der Fall. Die p16-Expression nahm im Unterschied zu p21 in den Zellen aller vorhandenen Differenzierungsstadien (MF III – PMF VI) gegenüber den Kontrollpopulationen zu, die Zunahme war dabei bei den früheren Stadien MF III und PMF IV doppelt so groß wie bei den späteren Stadien PMF V und IV.

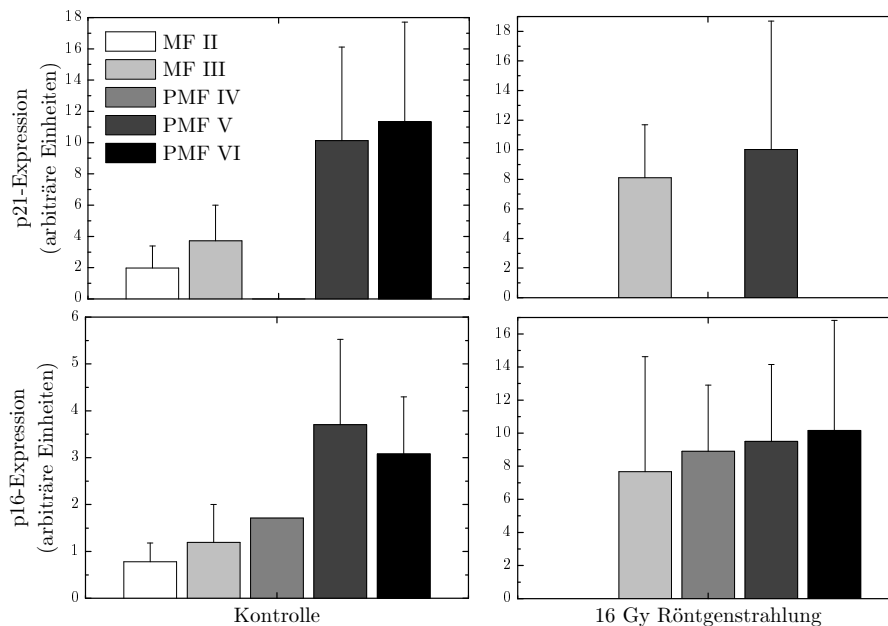


Abbildung 4.20: Durchschnittliche p21- und p16-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium, 9 Tage nach Bestrahlung. Daten aus Experiment „2/06“. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen den einzelnen Zellen wieder. Eine weitere Beschreibung der Grafiken befindet sich im Abschnitt 4.2.2.2

4.2.1.7 Zusammenfassung: Phase I – Entwicklung direkt nach Bestrahlung

Die Bestrahlung von Fibroblasten mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen führte zur Inhibition der Zellzyklusprogression in der G_0/G_1 -Phase, die mit steigender Dosis ausgeprägter war, wobei Kohlenstoff-Ionen wirksamer waren als Röntgenstrahlen. Die Inhibition der Zellzyklusprogression führte zum dosisabhängigen Rückgang der Proliferation in den bestrahlten Kulturen, der bei einem Teil der bestrahlten Populationen mit einer Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität einher ging.

Der Zellzyklusarrest ging bei den bestrahlten Fibroblasten mit einer Veränderung des Differenzierungsmusters einher. Der Anteil an MF II ging in den bestrahlten Kulturen dosisabhängig zurück, der Anteil an MF III nahm parallel dazu dosisabhängig zu, der Anteil an PMF war nur nach Bestrahlung mit 16 Gy Röntgenstrahlen dauerhaft größer als in der Kontrolle.

Gleichzeitig mit der Zellzyklusinhibition und der Differenzierung kam es auch zur Zunahme der p53-Menge und p21- und p16-Expression. Sowohl nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen als auch nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen nahm die p53- und p21-Expression zur gleichen Zeit zu, im Gegensatz dazu nahm die p16-Expression nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen früher und stärker zu als nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen. Die Einzelzellanalyse der Proteinexpression an mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen zeigte, dass nach Bestrahlung mit 8 Gy und 16 Gy eine Zellpopulation existierte, bei der sich die Expression von p21 und p16 nicht von der Kontrolle unterschied und

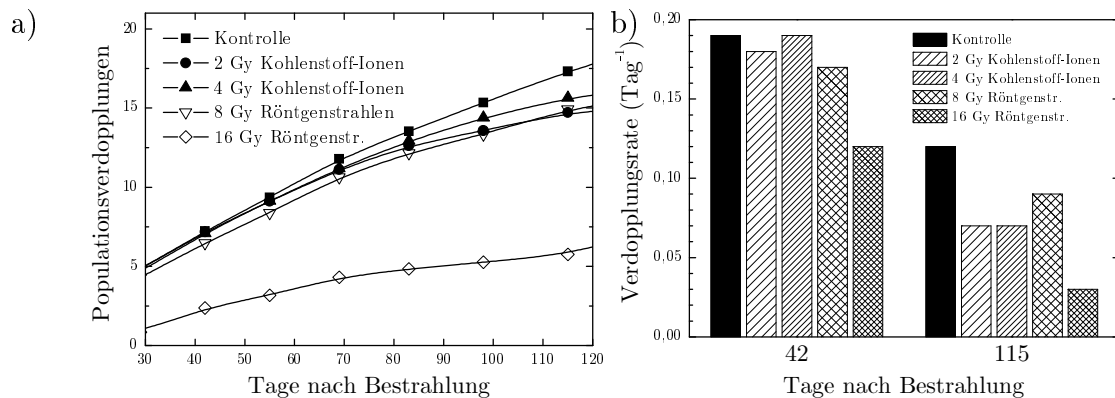


Abbildung 4.21: Entwicklung Proliferation, 42 bis 115 Tagen nach Bestrahlung. **(a):** Die Zunahme der Anzahl an PD ging zwischen 42 und 115 Tagen nach Bestrahlung in allen Kulturen zurück. **(b):** Der Rückgang der Verdopplungsrate war bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen größer als bei der Kontrolle. Die Verdopplungsrate unterschied sich bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen deutlich von den anderen ursprünglich bestrahlten Kulturen. Daten aus Experiment „8/04“.

deren Anteil etwa den Zellen entsprach, die zu diesem Zeitpunkt proliferierten. Die p21- und p16-Expression korrelierte mit dem Differenzierungsgrad der Zellen, sie nahm in Folge der Bestrahlung bei den früheren Stadien stärker zu als bei den späteren Stadien.

Die Expression der Zellzyklusinhibitoren ging in den bestrahlten Zellen und deren Nachkommen nach etwa 35 Tagen wieder zurück, gleichzeitig unterschied sich in diesen Kulturen die Proliferationsrate nicht von der Kontrollpopulation. Das Differenzierungsmuster dieser Kulturen glich sich ebenfalls der Kontrolle an. Die mit 16 Gy bestrahlten Zellen unterschieden sich dagegen weiter deutlich von der Kontrollpopulation.

4.2.2 Phase II: Intermediäre Entwicklung der Nachkommen

Der vorangegangene Teil beschrieb die Entwicklung in einem Zeitraum, in dem sich die Kulturen zunächst überwiegend aus den direkt von der Strahlung betroffenen Zellen zusammensetzten, danach jedoch die proliferierenden Nachkommen dieser Zellen einen größer werdenden Anteil der Kultur darstellten. Im folgenden Abschnitt wird die weitere Entwicklung dieser Nachkommen der bestrahlten Zellen gezeigt.

4.2.2.1 Proliferation

Abbildung 4.21 zeigt die Entwicklung der Populationsverdopplungen (PD) zwischen 42 und 115 Tagen nach der Bestrahlung und die Verdopplungsrate am Anfang und Ende dieses Zeitraums. Nach 42 Tagen unterschieden sich die Zahl der PD und die Verdopplungsrate in den Nachkommen der bestrahlten Zellen nicht von der Kontrolle. Eine Ausnahme stellte die mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur dar, bei ihr lag die Zahl der PD und die Verdopplungsrate deutlich unter der der Kontrolle. In der

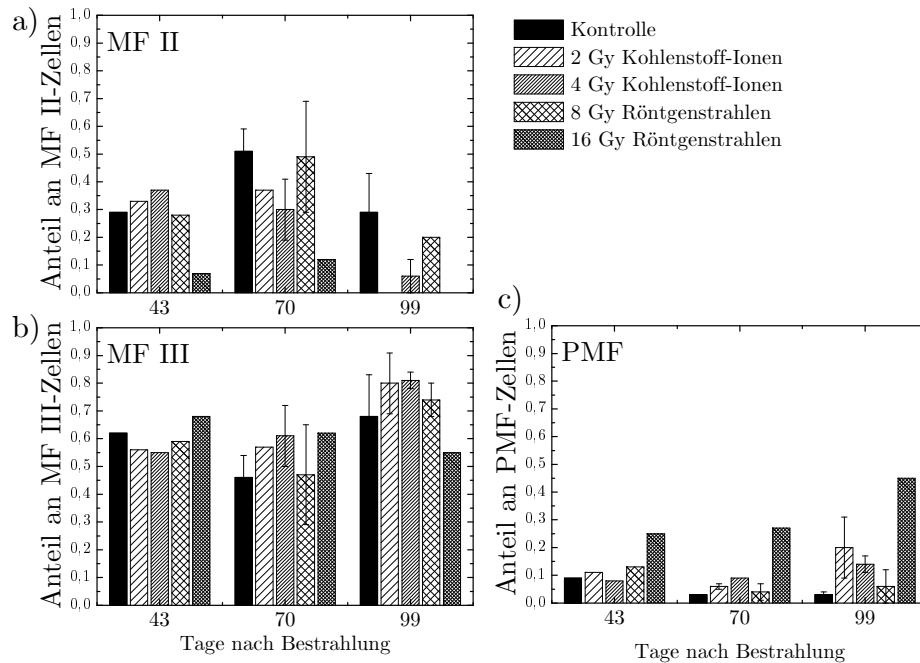


Abbildung 4.22: Differenzierungsmuster der AG 1522 Fibroblasten zwischen 43 und 99 Tagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen. Daten aus Experiment „8/04“. Eine weitere Beschreibung der Grafiken befindet sich im Abschnitt 4.2.2.2

darauf folgenden Zeit zwischen 42 und 115 Tagen ging die Verdopplungsrate bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen stärker zurück als bei der Kontrolle. Der Rückgang der Verdopplungsrate war in allen Populationen etwa gleich groß, bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen dagegen deutlich größer.

4.2.2.2 Differenzierung

Die Abbildungen 4.22a-c zeigen die Anteile der Fibroblasten, die sich in der Zeit zwischen 43 und 99 Tagen nach der Bestrahlung in den Stadien MF II, MF III und PMF befanden. Anschließend an die Entwicklung in Phase I unterschied sich der MF II-Anteil bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen auch zwischen 43 und 70 Tagen nicht von dem der Kontrolle. In der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Kultur war der MF II-Anteil dagegen weiterhin deutlich niedriger als in den anderen Kulturen. Nach 99 Tagen war der MF II-Anteil in den ursprünglich mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen deutlich gegenüber der Kontrolle zurückgegangen, unter den Nachkommen der mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen und 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen befanden sich keine MF II-Fibroblasten mehr.

Der Anteil an MF III-Fibroblasten war zwischen 43 und 70 Tagen in allen bestrahlten Kulturen etwa so hoch wie in der Kontrolle. Nach 99 Tagen nahm der Anteil bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen gegenüber der Kontrolle sogar zu. In der mit 16 Gy

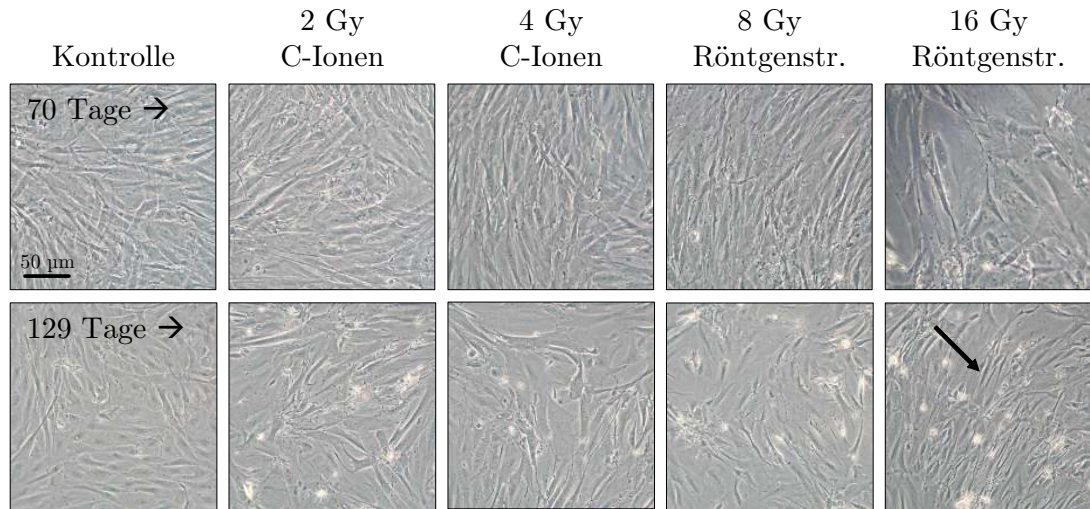


Abbildung 4.23: Zellmorphologie unfixierter Zellen, 70 und 129 Tage nach Bestrahlung im Phasenkontrastmikroskop fotografiert. **Oben:** 70 Tage nach Bestrahlung unterschied sich die Zellen in den ursprünglich mit 2 Gy und 4 Gy bestrahlten Kulturen nicht von den Kontrollzellen. Die Zellen in der ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur unterschieden sich dagegen deutlich von den Kontrollzellen, sie waren größer und hatten eine verzweigte Gestalt. **Unten:** 129 Tage nach Bestrahlung unterschieden sich die Zellen in den ursprünglich bestrahlten Kulturen ebenfalls von den Kontrollzellen, sie waren größer und stärker verzweigt. Ein Großteil mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur bestand dagegen aus kleinen Zellen, die dichte Zellverbände bildeten (**Pfeil**).

bestrahlten Kultur kam es dagegen nicht zu einer Zunahme des MF III-Anteils.

Der Anteil an postmitotischen Fibroblasten (PMF) blieb zwischen 43 und 70 Tagen bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen unverändert und war so hoch wie in der Kontrolle, mit Ausnahme der mit 16 Gy bestrahlten Kultur, bei der der PMF-Anteil deutlich höher war als in den anderen Kulturen. Nach 99 Tagen hatte der Anteil postmitotischer Zellen in allen ursprünglich bestrahlten Kulturen auf Werte zugenommen, die über denen der Kontrolle lagen, dabei war die Zunahme bei den Nachkommen der mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen und 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen am größten.

Die zwischen 70 und 99 Tagen bei den Nachkommen der bestrahlten Kulturen beobachteten Unterschiede im Differenzierungsmuster spiegelten sich auch im Erscheinungsbild der unfixierten Zellen wider (Abbildung 4.23). Nach 70 Tagen enthielt nur die ursprünglich mit 16 Gy bestrahlte Kultur einen gegenüber der Kontrolle deutlich erhöhten Anteil an großflächigen und stark verzweigten Zellen. Nach 129 Tagen unterschieden sich dagegen auch die Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Kulturen von der Kontrolle. Die mit ursprünglich 16 Gy bestrahlte Kulturen enthielt zu diesem Zeitpunkt einen zunehmenden Anteil kleiner und nadelförmiger Zellen, die in keiner der anderen Kulturen beobachtet wurden (siehe Pfeil).

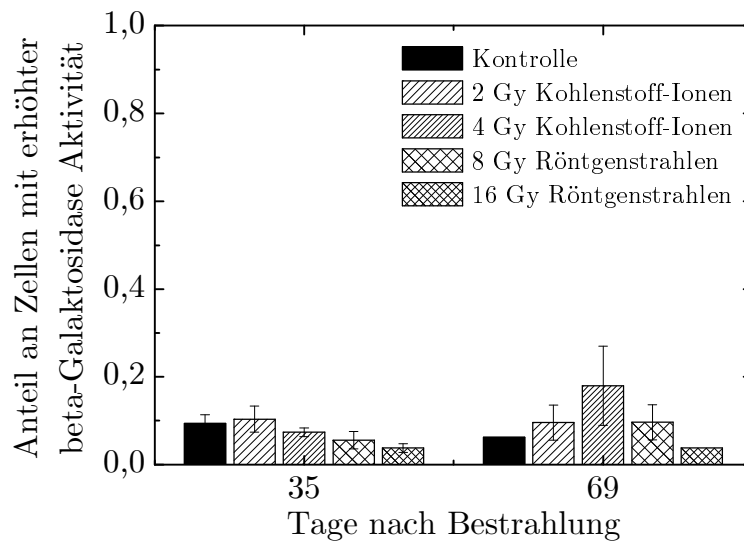


Abbildung 4.24: Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase war zwischen 35 und 69 Tagen nach der Bestrahlung in allen Populationen niedrig und schwankte in den ursprünglich bestrahlten Populationen um die Kontrollwerte. Fehlerbalken: Standardabweichung aus zwei Proben. Daten aus Experiment „8/04“.

4.2.2.3 Entwicklung der β -Galaktosidase-Aktivität

Abbildung 4.24 zeigt den Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität die 35 und 69 Tage nach der Bestrahlung ausgesät und 14 Tage später analysiert wurden. Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität schwankte in den ursprünglich bestrahlten Populationen im Bereich der Kontrollwerte.

4.2.2.4 Proteinexpression

Die Abbildungen 4.25a-c zeigen die *Western-Blot*-Ergebnisse zwischen 43 und 130 Tagen nach Bestrahlung. Die zellulären Proteinmengen von p53 und p21 entsprachen bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen den Werten der Kontrolle. Die p16-Expression nahm dagegen ab etwa 60 Tage gegenüber der Kontrolle kontinuierlich zu. In der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Kultur trat im Unterschied zu den anderen Kulturen eine deutliche Änderungen der Expression von p53, p21 und p16 auf: Es kam sowohl zu einer vierfachen Erhöhung der p53-Menge als auch zu einer Zunahme der p16-Expression auf das Vierfache des Kontrollniveaus. Parallel dazu ging die p21-Expression auf das Niveau der Kontrolle zurück.

4.2.2.5 Zusammenfassung: Phase II

Die Proliferation der Nachkommen der bestrahlten Zellen war nach 40 Tagen der Kontrolle ähnlich, ging aber in der darauf folgenden Zeit schneller zurück als bei der Kontrolle,

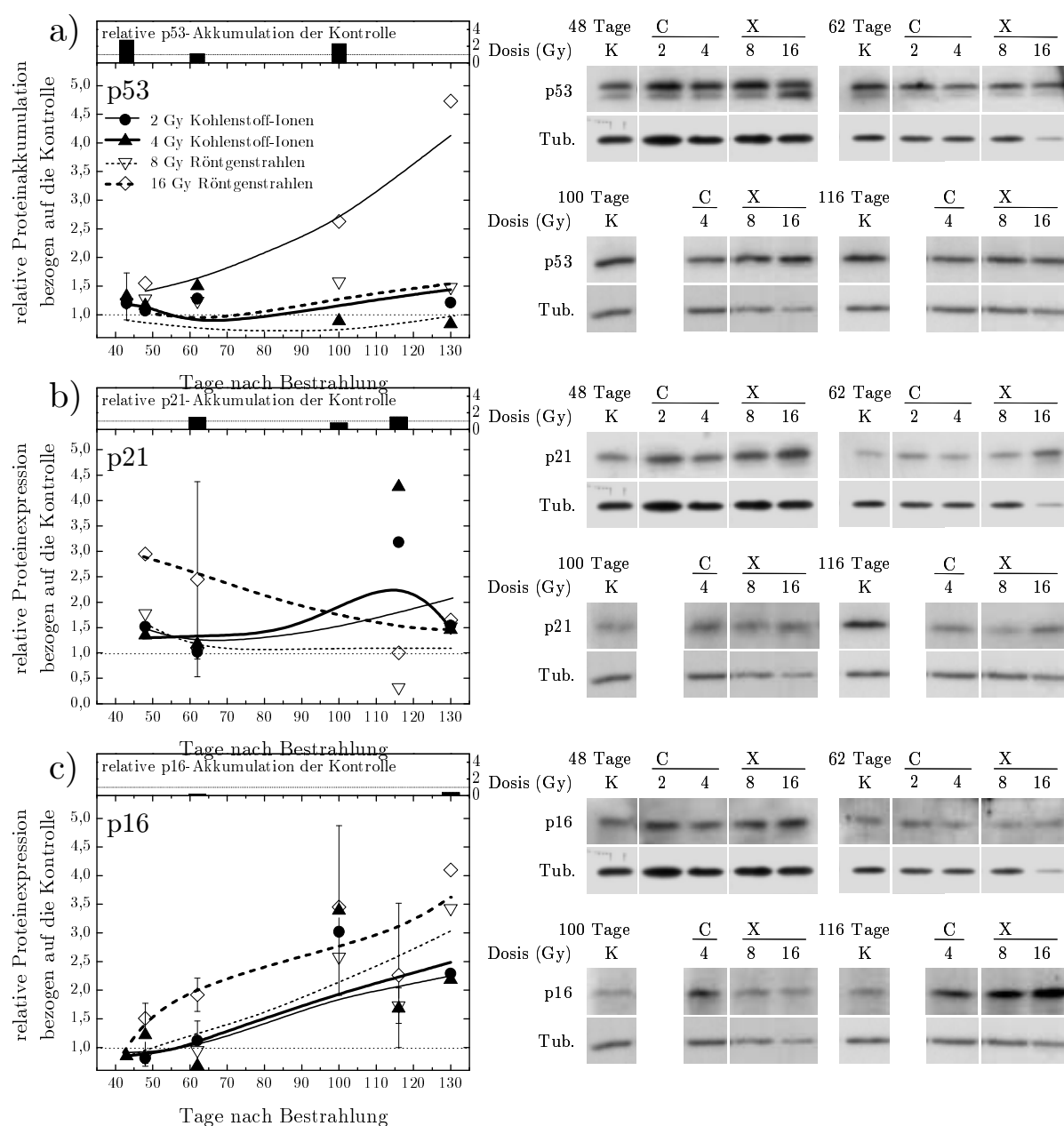


Abbildung 4.25: Relative Akkumulation bzw. Proteinexpression von p53, p21 und p16 im Zeitraum von 43 bis 130 Tagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (C) und Röntgenstrahlen (X) im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle (K). Die links abgebildeten Grafiken zeigen die densitometrisch ermittelte relative Akkumulation bzw. Expression der Proteine. Rechts sind exemplarisch *Western-Blots* aus Experiment „8/04“ abgebildet. Die Quantifizierung ist jeweils auf die Kontrolle zum selben Zeitpunkt bezogen, der Bezugspunkt wird durch die gepunktete Linie repräsentiert. Die Balken im oberen Teil der Abbildungen zeigen die relative Proteinexpression der Kontrolle bezogen auf den Anfangszeitpunkt. Die Daten stammen aus den Experimenten „8/04“ und „2/05“, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus diesen zwei Experimenten. Eine weitere Beschreibung der Abbildung befindet sich im Abschnitt 4.2.2.4.

wobei sie bei den mit ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Zellen gegenüber den Nachkommen der anderen bestrahlten Populationen deutlich geringer war. Der Rückgang der Proliferation wurde ab 70 Tage nach Bestrahlung von einer Differenzierung begleitet, dabei kam es bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen zu einer Zunahme des MF III-Anteils. Eine Ausnahme davon war die ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Population, in der es statt dessen zu einem Anstieg des PMF-Anteils kam und ein Zelltyp mit nadelförmiger Gestalt auftrat.

Der Rückgang der Proliferation und die zunehmende Differenzierung wurde bei den Nachkommen der bestrahlten Kulturen von einer Erhöhung der an p16-Expression begleitet, die zellulären Proteinmengen von p21 und p53 nahmen dagegen nicht zu. Eine Ausnahme stellte die ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Kultur dar, bei der es zu einer Zunahme der zellulären Mengen an p53 und p16 und gleichzeitig zu einem Rückgang der p21-Expression kam.

4.2.3 Phase III: Spätentwicklung der Nachkommen

In den vorherigen Abschnitten (4.2.1 und 4.2.2) wurde gezeigt, dass sich bestrahlte Fibroblasten hinsichtlich ihrer Zellzyklusprogression, Proliferation, Proteinexpression, Morphologie und Differenzierung zunächst deutlich von den Kontrollen unterschieden, diese Unterschiede aber bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen nach wenigen Wochen nicht mehr zu beobachten waren (Phase I und Phase II). Die Spätentwicklung der Nachkommen der bestrahlten Zellen wird im folgenden Teil gezeigt.

4.2.3.1 Proliferation

Abbildung 4.26 zeigt die Entwicklung der Anzahl an Populationsverdopplungen (PD) zwischen 130 und 250 Tagen nach Bestrahlung und die tägliche Verdopplungsrate der Fibroblasten am Anfang, in der Mitte und am Ende dieses Zeitraums. Die Verdopplungsrate der Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen ging zwischen 148 und 189 Tagen schneller zurück als die der Kontrollzellen. Nach 189 Tagen kam es bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen zum Stillstand der Proliferation, bei den Kontrollzellen war dies dagegen erst 14 Tage später der Fall. Die bis zu diesem Zeitpunkt erreichte Anzahl an PD war bei den Nachkommen der bestrahlten Kulturen ähnlich groß, lag jedoch deutlich unter der der Kontrolle.

Die Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen unterschieden sich in ihrer Proliferationsaktivität deutlich von der Kontrolle und den anderen ursprünglich bestrahlten Populationen: Die Proliferationsaktivität nahm nach 144 Tagen sehr stark zu, die tägliche Verdopplungsrate war sogar deutlich höher als in der Kontrolle. Die Proliferationsrate blieb in dieser Kultur bis über 189 Tage hinaus erhöht und ging danach kontinuierlich zurück, so dass nach 250 Tagen keine weitere Zunahme der Zahl der PD gemessen werden konnte.

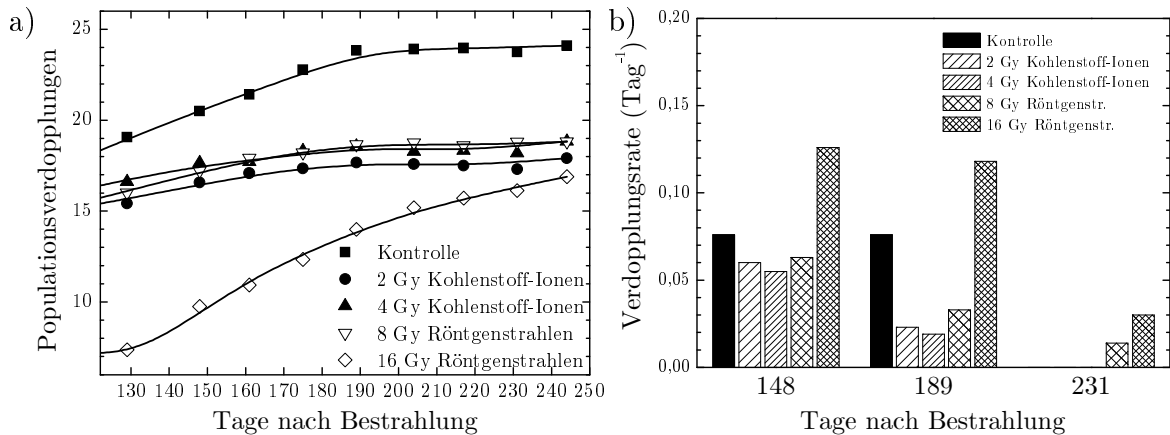


Abbildung 4.26: Entwicklung der Proliferation ab 130 Tage nach Bestrahlung bis zur replikativen Seneszenz. **(a):** Die Anzahl der Populationsverdopplungen nahm bei den Nachkommen der bestrahlten Kulturen zwischen 148 und 189 Tagen kontinuierlich langsamer zu als bei der Kontrolle und erhöhte sich nach 189 Tagen nicht mehr. Eine Ausnahme waren die Nachkommen der ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen, bei denen es nach 148 Tagen zu einer sehr starken Zunahme der Populationsverdopplungen kam. **(b):** Die Verdopplungsrate der bestrahlten Kulturen lag ab 189 Tage bereits deutlich unter der Kontrolle, mit Ausnahme der ursprünglich mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur, deren Verdopplungsrate deutlich über der Kontrolle lag. Daten aus Experiment „8/04“.

4.2.3.2 Differenzierung

Die Abbildungen 4.27a-c zeigen den Anteil an Fibroblasten im Stadium MF II, MF III den Anteil an PMF in der Zeit zwischen 129 und 219 Tagen nach Bestrahlung. Der Anteil an MF II-Fibroblasten war nach 129 Tagen in den Nachkommen der bestrahlten Zellen niedriger als in der Kontrolle, wobei die ursprünglich mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen und 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen bereits keine MF II-Fibroblasten mehr enthielten. Nach 177 und 219 Tagen war der Anteil an MF II-Fibroblasten in der Kontrolle und den Nachkommen der mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen ebenfalls zurückgegangen und betrug weniger als 5 %.

Der Anteil der MF III-Fibroblasten war nach 129 Tagen in den Nachkommen der bestrahlten Zellen ähnlich groß wie in der Kontrollpopulation und nahm in der darauf folgenden Zeit in allen Kulturen weiter zu. Nach 219 Tagen befanden sich über 80 % der Zellen im Stadium MF III.

Der PMF-Anteil war in der Kontrollpopulation mit weniger als 5 % nach 129 Tagen weiterhin deutlich niedriger als in den Nachkommen der bestrahlten Zellen. In der darauf folgenden Zeit nahm der Anteil an PMF in der Kontrolle zu und blieb bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen weitgehend unverändert. Nach 219 Tagen lag der Anteil an PMF in der Kontrolle unter 5 % und in den Nachkommen der bestrahlten Zellen im Bereich von 10 %.

Die bei den Nachkommen der bestrahlten Kulturen beobachtete Unterschiede im Diffe-

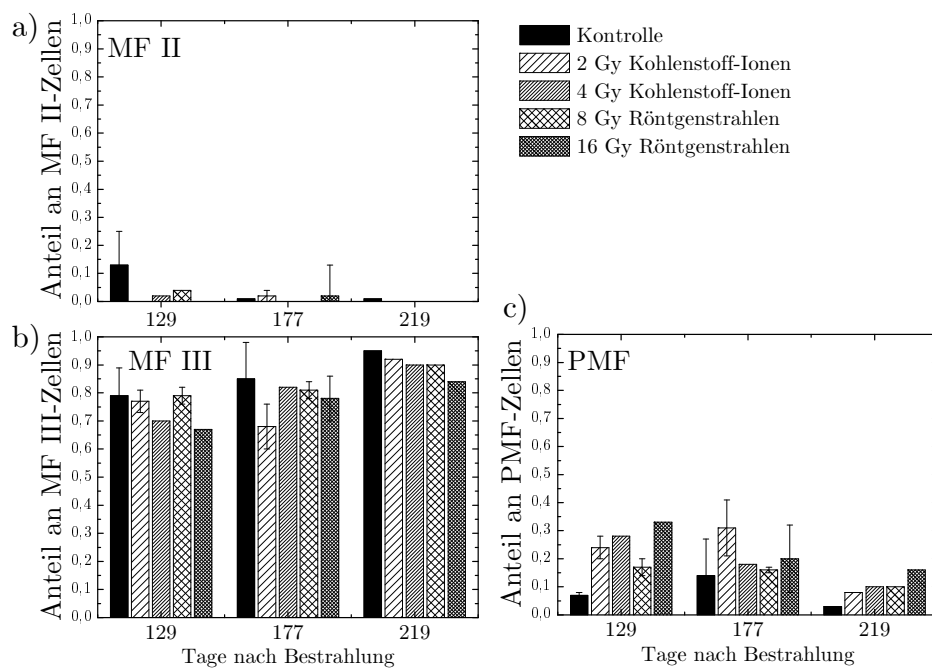


Abbildung 4.27: Differenzierungsmuster der AG 1522 Fibroblasten zwischen 99 und 219 Tagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen. Daten aus Experiment „8/04“. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei Proben wieder. Eine weitere Beschreibung der Grafiken befindet sich im Abschnitt 4.2.3.2

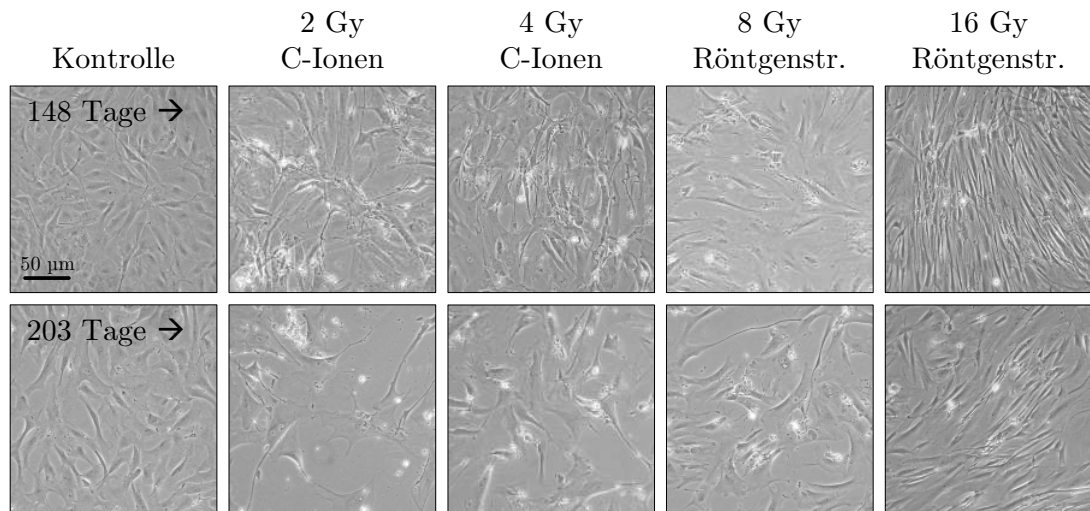


Abbildung 4.28: Zellmorphologie unfixierter Zellen aus Experiment „8/04“, 148 Tage und 203 Tage nach Bestrahlung im Phasenkontrastmikroskop fotografiert. **Oben:** Die Kontrollzellen hatten nach 148 Tagen eine homogene Form mit einer größeren Zellfläche als zu früheren Zeitpunkten. Die Nachkommen der mit 2 Gy, 4 Gy und 8 Gy bestrahlten Zellen enthielten große heterogene Zellen mit gestreckter Morphologie. Die Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen enthielten überwiegend Zellen mit kleiner und länglicher Form, der in den anderen Kulturen nicht zu finden war. **Unten:** Nach 203 Tagen war der Anteil an kleinen und langen Zellen in der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlte Kultur zurückgegangen.

renzierungsmuster spiegelten sich auch im Erscheinungsbild der unfixierten Zellen wider (siehe Abbildung 4.28). Zwischen 148 und 203 Tagen befand sich unter den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen ein großer Anteil an Zellen mit vergrößerter Zellfläche und einer verzweigten und heterogenen Gestalt. Eine Ausnahme waren die Nachkommen der mit ursprünglich 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen, sie hatten eine homogene Form und die Zellen bildeten sehr dichte Zellverbände und waren nadelförmig und deutlich kleiner. Die Kontrolle bestand dagegen aus größeren spindelförmigen Zellen mit homogener Gestalt. Nach 203 Tagen und nach dem Stillstand der Proliferation hatte sich die Zusammensetzung der Kontrolle und der ursprünglich bestrahlten Kulturen bis auf einen Rückgang der Zelldichte nicht weiter verändert. Bei den Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen war jedoch der Anteil der kleinen und dicht wachsenden Zellen wieder zurückgegangen.

4.2.3.3 Entwicklung der β -Galaktosidase-Aktivität

Abbildung 4.29 zeigt den Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität die 175 und 204 Tage nach der Bestrahlung ausgesät und 14 Tage später analysiert wurden. Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität war in allen Populationen weiterhin niedrig. Er nahm nach dem Eintritt in die replikative Seneszenz in der Kontrolle und den ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen nur geringfügig zu und war in den ursprünglich mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen sehr niedrig.

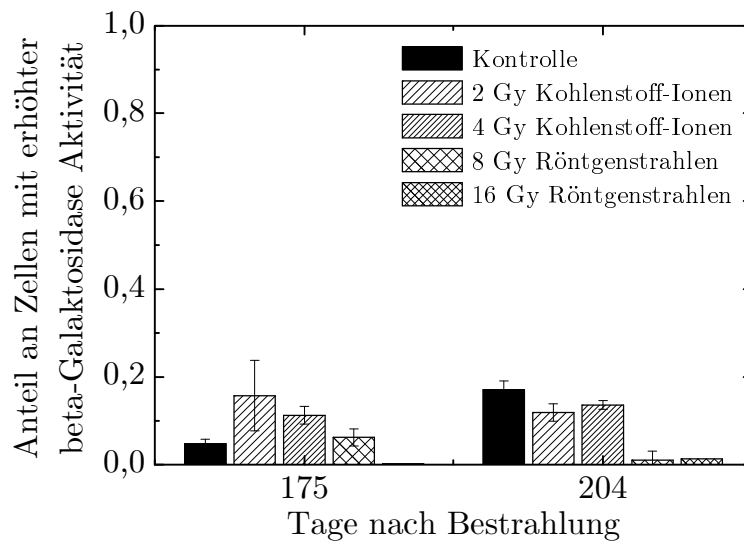


Abbildung 4.29: Der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase war zwischen 175 und 204 Tagen nach der Bestrahlung in allen Populationen weiterhin niedrig und erhöhte sich auch nach dem Eintritt in die replikative Seneszenz nur geringfügig. In den ursprünglich mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen war der Anteil mit erhöhter Enzymaktivität sehr niedrig. Fehlerbalken: Standardabweichung aus zwei Proben. Daten aus Experiment „8/04“.

4.2.3.4 Proteinexpression

Die Abbildungen 4.30a-c zeigen die relative Expression von p53, p21 und p16 zwischen 130 und 250 Tagen nach Bestrahlung, bezogen auf die Werte für die Kontrollpopulation jedes Zeitpunkts. Die am Ende von Phase II beobachtete Entwicklung setzte sich fort, die Akkumulation von p53 unterschied sich bei den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen weiter nicht von der Kontrollpopulation. Parallel dazu war in den ursprünglich mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen auch keine erhöhte zelluläre Menge an Serin 15-phosphoryliertem p53 vorhanden (Abbildung 4.31). Eine Ausnahme waren die Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen, bei ihnen nahm die p53-Menge zunächst weiter zu, nach 177 Tagen war sie gegenüber der Kontrolle am höchsten. Zum gleichen Zeitpunkt war die zelluläre Menge an Serin 15-phosphoryliertem p53 etwa fünfmal größer als in der Kontrollpopulation. Nach 180 Tagen nahm die Menge an p53 in der mit 16 Gy bestrahlten Kultur deutlich ab.

Die p21-Expression war bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen uneinheitlich und schwach ausgeprägt. In den ursprünglich mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen stieg die p21-Expression auf ähnliche Werte und ging nach 180 Tagen zurück. In der ursprünglich mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kultur unterschied sich die p21-Expression dagegen nicht von der Kontrolle. Bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nahm die p21-Expression sehr stark ab und lag weit unter dem Niveau der Kontrolle, obwohl es zur gleichen Zeit zu einer

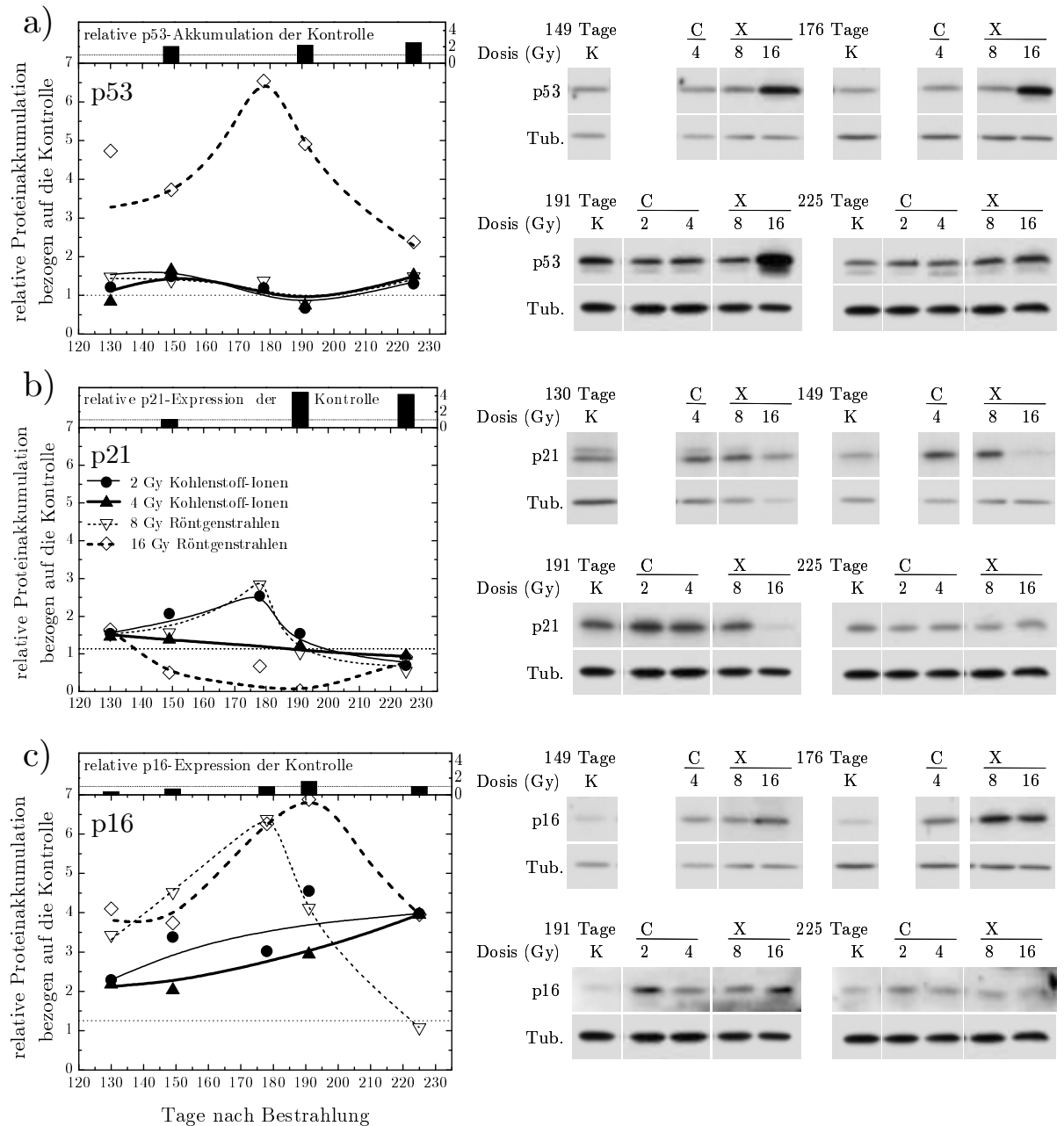


Abbildung 4.30: Relative Akkumulation bzw. Proteinexpression von p53, p21 und p16 im Zeitraum von 130 bis 225 Tagen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen (C) und Röntgenstrahlen (X) im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle (K). Die links abgebildeten Grafiken zeigen die densitometrisch ermittelte relative Akkumulation bzw. Expression der Proteine. Rechts sind exemplarisch *Western-Blots* aus Experiment „8/04“ abgebildet. Die Quantifizierung ist jeweils auf die Kontrolle zum selben Zeitpunkt bezogen, der Bezugspunkt wird durch die gepunktete Linie repräsentiert. Die Balken im oberen Teil der Abbildungen zeigen die relative Proteinexpression der Kontrolle bezogen auf den Anfangszeitpunkt. Die Daten stammen aus dem Experiment „8/04“. Eine weitere Beschreibung der Abbildungen befindet sich im Abschnitt 4.2.3.4.

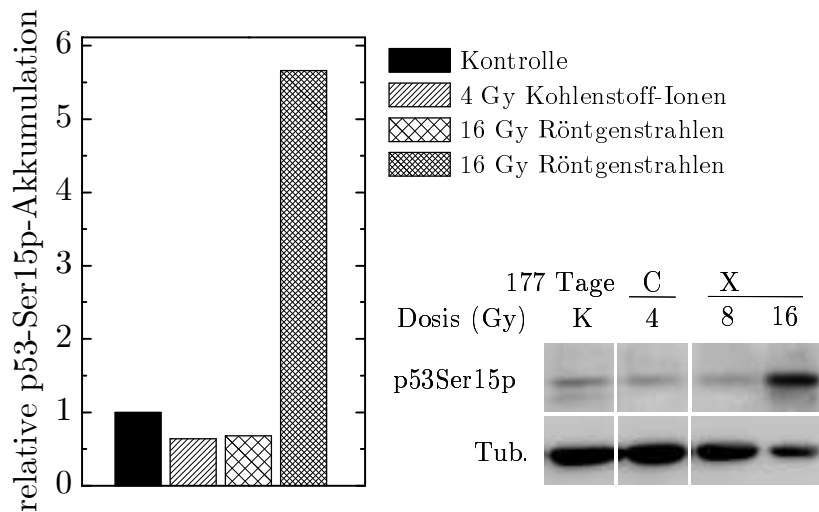


Abbildung 4.31: Akkumulation von Serin-15-phosphoryliertem p53, 177 Tage nach Bestrahlung. Das Histogramm zeigt die densitometrisch ermittelte relative Akkumulation des Proteins, bezogen auf die Kontrolle. Rechts ist der zugrunde liegende *Western-Blot* aus Experiment „8/04“ abgebildet. Eine weitere Beschreibung der Abbildung befindet sich im Abschnitt 4.2.3.4.

starken Akkumulation und Phosphorylierung von p53 in dieser Population kam. Dieser Rückgang der p21-Expression bei gleichzeitig starker Akkumulation von p53 wurde zu mehreren Zeitpunkten zwischen 150 und 190 Tagen deutlich beobachtet. Am Ende des untersuchten Zeitraums, nach etwa 225 Tagen, bestand zwischen der p21-Expression bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen und der Kontrolle kein Unterschied mehr.

Die Expression von p16 war zwischen 130 und 225 Tagen nach der Bestrahlung in allen Nachkommen der bestrahlten Zellen gegenüber der Kontrolle erhöht, wobei sie nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen weniger deutlich zunahm als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen. Die p16-Expression verlief bei den verschiedenen Dosen einer Strahlenqualität ähnlich: Bei den Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen nahm sie kontinuierlich zu, bei den Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen nahm sie zunächst ebenfalls zu, nach etwa 190 Tagen kam es jedoch zu einer Abnahme der p16-Expression, die in den ursprünglich mit 8 Gy bestrahlten Kulturen früher auftrat als in den ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Kulturen.

4.2.3.5 Zusammenfassung: Phase III – Spätentwicklung

Der in Phase II beobachtete Rückgang der Proliferation setzte sich auch während Phase III fort. Das Wachstum der Population endete bei den Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nach etwa 180 Tagen und damit früher als in der Kontrolle, bei der es erst nach etwa 200 Tagen zum Stillstand des Populationswachstums kam. Bei einem kleinen Teil der Kontrolle und den ursprünglich bestrahlten Populationen nahm dabei die β -Galaktosidase-Aktivität zu. Bei den Nach-

kommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen kam es dagegen nach 150 Tagen zu einer starken Zunahme der Teilungsaktivität. Parallel zum Rückgang der Proliferation verschob sich das Differenzierungsmuster der Fibroblasten zu späteren Stadien und blieb nach 177 Tagen weitgehend stabil, wobei die Veränderungen bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen früher auftrat. Die ursprünglich mit 16 Gy bestrahlte Kultur enthielt zu einem großen Anteil kleine und längliche Zellen, die sehr dicht wuchsen und in keiner anderen Population auftraten.

Während des Rückgangs der Proliferation wurde bei den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen keine gegenüber der Kontrolle erhöhte p53-Menge beobachtet, es kam jedoch in einem Teil der bestrahlten Kulturen zu einer Zunahme der p21-Expression, die nach dem Stillstand der Proliferation wieder zurückging. Die Expression von p16 nahm parallel dazu deutlich zu, im Unterschied zu den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen ging die p16-Expression jedoch in den mit Röntgenstrahlung bestrahlten Kulturen nach dem Stillstand der Proliferation wieder zurück. Eine Ausnahme waren die Nachkommen der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Zellen, bei ihnen kam es während der starken Zunahme der Proliferation zu einer deutlichen Zunahme und Phosphorylierung von p53, die von einem ausgeprägten und untypischen Rückgang der p21-Expression und einer Zunahme von p16 begleitet wurde.

5 Diskussion

5.1 Alterung unbestrahlter Vorhautfibroblasten

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der nach Bestrahlung auftretenden vorzeitigen Seneszenz und deren Bezug zur terminalen Differenzierung. Normale Fibroblasten teilen sich *in-vitro* nicht unbegrenzt. Das Beenden der Teilungsaktivität wird als replikative Seneszenz bezeichnet (Hayflick und Moorhead 1961). Der dabei auftretende Phänotyp wird als zelluläre Seneszenz bezeichnet und unterscheidet sich gegenüber der teilungsaktiven Phase durch die Veränderung der Zellmorphologie und Proteinexpression (Übersicht in: Cristofalo u. a. 2004). Außerdem führt die Kultivierung von Fibroblasten zu ihrer terminalen Differenzierung, die durch das sequentielle Durchlaufen von morphologisch unterscheidbaren Stadien und einer dem Stadium entsprechenden Proteinexpression charakterisiert wird (Bayreuther u. a. 1988; Rodemann u. a. 1989). Bestrahlung kann ebenfalls zum Beenden der Teilungsaktivität und zur vorzeitigen Seneszenz der Zellen führen. Um diese strahleninduzierte Entwicklung mit der von unbestrahlten Fibroblasten vergleichen zu können, wurde zuerst die Entwicklung der verwendeten Fibroblasten bis zum Erreichen des Stillstands der Proliferation untersucht.

5.1.1 Kontinuierlicher Rückgang der Proliferation

Im Laufe der Kultivierung ging die durchschnittliche Verdopplungsrate der Fibroblasten kontinuierlich zurück (Abbildung 4.3, S. 49). Nach 23 Passagen und dem Erreichen einer kumulativen Zahl von Verdopplungen von 48 nahm die Zellzahl nicht mehr zu, bis zu diesem Punkt wurden die Zellen über 180 Tage kultiviert. Während des Rückgangs der Proliferation nahm das Zellvolumen und, in geringerem Umfang, die β -Galaktosidase-Aktivität zu (Abbildung 4.4, S. 50 bzw. Abbildung 4.5, S. 51).

Der beobachtete kontinuierliche Rückgang der durchschnittlichen Verdopplungsrate zeigt, dass zwischen den Passagen bei einem zunehmenden Teil der Fibroblasten die Teilungsfähigkeit entweder abnahm oder ganz verloren ging. Deshalb endete das Wachstum der Population nicht innerhalb eines kurzen Zeitraums, sondern über mehrere Monate. Die regelmäßige Subkultivierung der Fibroblasten bewirkte dabei eine Ausdünnung derjenigen Fibroblasten, die nur noch langsam oder gar nicht mehr proliferierten, so dass sich die Zellkultur zunehmend aus den Subpopulationen zusammensetzte, die noch teilungsaktiv waren. Die Zusammensetzung der Zellkultur veränderte sich demnach während der Kultivierung kontinuierlich: Zu Beginn der Kultivierung waren noch Subpopulationen mit unterschiedlichem Teilungspotential vorhanden, am Ende des Populationswachstums

bestand die Kultur nur noch aus derjenigen Subpopulation, die von allen das größte Teilungspotential hatte.

Die AG 1522 Fibroblasten wurde in früheren Arbeiten nicht bis zum Ende ihrer Proliferationsfähigkeit kultiviert (Fournier 1999; Fournier u. a. 2001; Berger 2001). Die in dieser Arbeit beobachtete Entwicklung der Proliferation dieser Zellen bis zu einer CPD von etwa 48 entspricht den Ergebnissen anderer Untersuchungen mit unterschiedlichen normalen Fibroblasten-Zell-Linien. So beobachteten Bayreuther u. a. (1988) und Rode mann u. a. (1989), dass primäre Hautfibroblasten (HH-8, Alter der Spenderin: 8 Jahre, Abdominalregion) bei kontinuierlicher Kultivierung eine maximale CPD im Bereich von 47–54, wobei die Verdopplungsrate während der Kultivierung ebenfalls kontinuierlich zurückging. Bei neonatalen Vorhautfibroblasten (BJ/HCA2 (Bond u. a. 1999; Beausejour u. a. 2003)), fötalen und embryonalen Lungenfibroblasten (WI-38 (Itahana u. a. 2003), IMR-90 (Stein u. a. 1999; Dulic u. a. 2000)) und embryonalen Fibroblasten (HE7, Abdominalregion (Watanabe u. a. 1992)) wurde eine ähnliche Entwicklung beobachtet, wobei Fibroblasten adulten bzw. neonatalen Ursprungs im Allgemeinen eine niedrigere CPD erreichten (ca. CPD 50) als fötale Fibroblasten (ca. CPD 80, Brookes u. a. 2004). Auch die Zunahme des Zellvolumens (Mitsui und Schneider 1976a, b; Sherwood u. a. 1988) deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren bei alternden Fibroblastenpopulationen. Die Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität deutet ebenfalls auf eine Alterung der Fibroblasten hin (Dimri u. a. 1995), jedoch wird diskutiert, ob eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität für die zelluläre Seneszenz spezifisch ist (Yegorov u. a. 1998; Krishna u. a. 1999; Severino u. a. 2000; Coates 2002; Yang und Hu 2005). Untersuchungen *in-vivo* und *in-vitro* sprechen vielmehr dafür, dass die erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase ein Indikator für generellen zellulären Stress ist und auch unabhängig von der replikativen Seneszenz auftreten kann (Kurz u. a. 2000; Going u. a. 2002; Lee u. a. 2006).

Zusammengenommen war die in der vorliegenden Arbeit für die AG 1522 Fibroblasten beobachtete Entwicklung während der Kultivierung hinsichtlich der CPD und Proliferation für normale Hautfibroblasten repräsentativ. Die beim Rückgang der Proliferation beobachtete Zunahme des Zellvolumens und, mit den oben genannten Einschränkungen, die Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität entsprachen der Entwicklung, die bei Fibroblasten beim Übergang in die zelluläre Seneszenz zu erwarten war.

5.1.2 Zunehmende Differenzierung

Der Differenzierungsgrad der Fibroblasten wurde anhand ihrer Zellmorphologie bewertet. Der Rückgang der Proliferation der AG 1522 Fibroblasten wurde von einer fortschreitenden Differenzierung begleitet, bei dem die Zellen vom Stadium MF II in das Stadium MF III übergingen. Der Anteil an PMF blieb jedoch während des Rückgangs der Proliferation bei etwa 10 % und erhöhte sich auch innerhalb von 42 Tagen nach dem Stillstand der Proliferation nicht. Das Erscheinungsbild der unfixierten Fibroblasten bestätigte diese Beobachtung, auch dort hatte nur ein kleiner Teil der Zellen ein vergrößertes Zytoplasma und stark verzweigter Gestalt. Der Anteil an PMF nahm nicht zu, obwohl

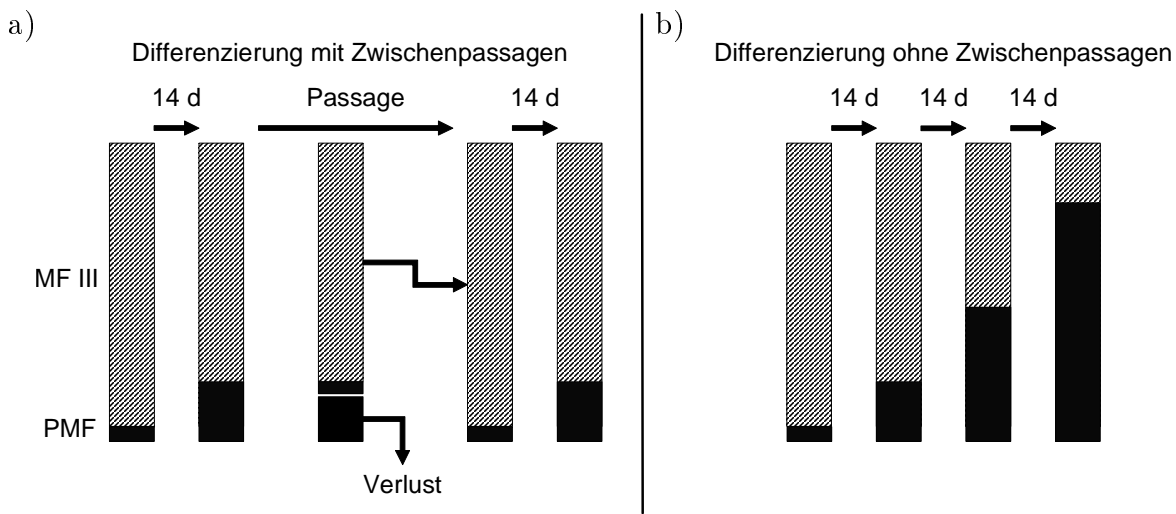


Abbildung 5.1: Schema der Selektion von PMF in Abhängigkeit vom Kultivierungsprotokoll. **(a):** Regelmäßiges Passagieren der Fibroblasten führt zum Verlust von PMF, wodurch ihr Anteil an der Gesamtpopulation konstant bleibt oder nur sehr langsam zunimmt. **(b):** In stationären Kulturen, bei denen es nicht zum Verlust der PMF kommt, steigt der Anteil an PMF dagegen im Laufe der Zeit schneller an.

von Passage zu Passage ein zunehmender Teil der Fibroblasten die Teilungsfähigkeit verlor. Da der PMF-Anteil jedoch auch nach dem Stillstand des Populationswachstums nicht zunahm und sich zu diesem Zeitpunkt trotzdem noch MF III-Fibroblasten in der Kultur befanden, trat der Verlust der Teilungsfähigkeit wahrscheinlich überwiegend im Differenzierungsstadium MF III auf.

Diese Ergebnisse stimmen zum Teil sehr gut mit den Ergebnissen von Bayreuther u. a. (1988) und Rodemann u. a. (1989) überein, auch dort wurde bei der kontinuierlichen Kultivierung von humanen Hautfibroblasten über einen ähnlichen Zeitraum überwiegend ein Übergang vom Stadium MF II in das Stadium MF III beobachtet. Von den dabei verwendeten normalen Hautfibroblasten befanden nach dem Stillstand der Proliferation etwa 80 % bis 100 % der Zellen im Stadium MF III, der übrige Teil der Zellen befand sich im Stadium PMF. Die Verdopplungszeit der MF III-Fibroblasten erstreckte sich bei Rodemann u. a. (1989, 1991) über einen 40 % längeren Zeitraum als die der MF II-Fibroblasten, dies erklärt den ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachteten kontinuierlichen Rückgang der Verdopplungsrate.

Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachteten Bayreuther u. a. (1988) innerhalb von 42 Tagen nach dem Stillstand der Proliferation eine Zunahme des Anteils postmitotischer Fibroblasten auf 100 %. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht direkt mit denen der vorliegenden Arbeit vergleichen, da bei Bayreuther u. a. (1988) nach dem Erreichen des Stillstands der Proliferation der Kultivierungsmodus geändert wurde: Die Zellen wurden in geringerer Zelldichte (1 500 Zellen/cm²) ausgesät, danach nicht mehr passagiert. Das Medium wurde in diesem Zeitraum nur einmal wöchentlich ausgetauscht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen im längsten Experiment

dagegen auch über den Stillstand der Proliferation hinaus im Abstand von 14 Tagen passagiert und dabei in höherer Dichte ausgesät ($10\,000\text{ Zellen/cm}^2$), wobei das Medium zwei Mal pro Woche ausgetauscht wurde. Die möglichen Einflüsse dieser Unterschiede auf die dem MFIII-Stadium folgende weitere Entwicklung der Fibroblasten wird im folgenden diskutiert:

Abstand der Passagen Das in der vorliegenden Arbeit regelmäßige Passagieren der nicht mehr proliferierenden Fibroblasten könnte zu einer Selektion der MFIII-Fibroblasten bzw. einem Verlust der PMF geführt haben, so dass eine Zunahme ihres Anteils nicht beobachtbar war (siehe Abbildung 5.1). Hinweise darauf gibt es in den Arbeiten von Goldstein u. a. (1969) und Vracko u. a. (1983), die bei Fibroblasten eine mit zunehmender Kultivierungsdauer abnehmende Anheftungseffizienz beobachteten.

Austausch des Kulturmediums Gealterte Fibroblasten sezernieren verschiedene Substanzen in das Kulturmedium (Matrix-Metalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und Cytokine (Übersicht in: Krtolica und Campisi 2002)), welche die Differenzierung der Fibroblasten fördern können (z. B. Fibronectin (Serini u. a. 1998), Interleukine (Saito u. a. 2003)). Durch den häufigeren Austausch des Kulturmediums in der vorliegenden Arbeit könnte die Wirkung dieser Faktoren verringert worden sein, was zu einer Stagnation oder Verlangsamung der Differenzierung führte.

Einfluss der Zelldichte Durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte höhere Zelldichte hatten die Zellen mehr Zell-Zell-Kontakte, die zu einer Verlangsamung des Differenzierungsprozesses geführt haben könnten. Bei Fibroblasten, die Zell-Zell-Kontakte auf Grund niedriger Zelldichte nicht aufbauen konnten, wurde ein größerer Anteil differenzierter Fibroblasten beobachtet als nach Kultivierung in hoher Zelldichte (Masur u. a. 1996). Daneben wird die terminale Differenzierung von Fibroblasten durch Cytokine, vor allem TGF- β , begünstigt (Lara u. a. 1996; Burger u. a. 1998; Evans u. a. 2003). Die Funktionalität und Signaltransmission der TGF- β -Rezeptoren verringert sich jedoch in Folge einer hohen Zelldichte (Petridou u. a. 2000), wodurch ihre Fähigkeit zur Differenzierung reduziert werden könnte. Außerdem wurde gezeigt, dass der Verlust von Zell-Zell-Kontakten dazu führt, dass aus tubulärem Epithel generierte Fibroblasten beschleunigt differenzieren (Masszi u. a. 2004).

Weitere Faktoren Bayreuther u. a. (1988) berichten, dass die Eigenschaften der bei der Kultivierung verwendeten Seren und Kulturgefäße eine wesentliche Voraussetzung für den Übergang vom mitotischen in das postmitotische Differenzierungsstadium sind. So konnten sie nur bei 2 von 9 Serum-Chargen und 3 von 11 Kulturschalen-Chargen einen Übergang in postmitotische Differenzierungsstadien beobachten. Der Einfluss dieser Faktoren wurde in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch

untersucht. In den Experimenten „8/04“ und „2/05“ wurden jedoch unterschiedliche Seren eingesetzt und eine unterschiedlich starke postmitotischen Differenzierung beim Übergang in die replikative Seneszenz beobachtet.

Zusammengefasst zeigt der Vergleich der Fibroblastenentwicklung in dieser Arbeit mit der Literatur, dass die in dieser Arbeit verwendeten humanen Vorhautfibroblasten im Laufe ihrer Kultivierung ebenfalls terminal differenzierten. Die Fibroblasten erreichten dabei während ihrer Kultivierung bis zum Stillstand der Proliferation das letzte mitotische Stadium (MF III). Der Übergang in die postmitotischen Stadien war nicht deutlich ausgeprägt, was wahrscheinlich auf die Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist. In anderen Arbeiten wurde das Durchlaufen postmitotischer Stadien erst nach dem Stillstand der Proliferation und nur unter speziellen Bedingungen beobachtet. Das Auftreten einer postmitotischen Differenzierung ist daher bei Fibroblasten möglicherweise nicht eine zwingende Begleiterscheinung der zellulären Seneszenz sondern eher eine Folge von äußeren Einflüssen.

5.1.3 Expression von Inhibitoren der Zellzyklusprogression

Für die zelluläre Seneszenz von Fibroblasten ist eine dauerhafte Inhibition der Zellzyklusprogression notwendig. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass das Tumorsuppressorprotein p53 und die CDK-Inhibitoren p21 und p16 dabei eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 5.2, Übersicht in: Bringold und Serrano 2000; Ben-Porath und Weinberg 2005). Die Induktion von p21 wird dabei bei Fibroblasten durch die Transaktivierung und Stabilisierung von p53 ausgelöst (Alcorta u. a. 1996; Webley u. a. 2000) und p21 inhibiert die Kinaseaktivität des CDK2/Cyclin E-Komplexes. Die Induktion von p16 kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden, die zur Transkription des INK4a-Lokus führen, über die daran beteiligten Signalwege ist jedoch wenig bekannt (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Induktion von p16 führt dabei zur Inhibition des CDK4,6/Cyclin D-Komplexes. Die aus der Induktion von p21 bzw. p16 resultierende fehlende Kinaseaktivität von CDK2/Cyclin E bzw. CDK4,6/Cylin D führt zur Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), das in diesem Zustand den Transkriptionsfaktor E2F bindet und inhibiert. Da E2F nur im ungebundenen Zustand die Transkription der Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen, die den Übergang von der G₀/G₁- in die S-Phase regulieren, auslöst, ist eine Inhibition der Zellzyklusprogression die Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurde während des Rückgangs der Proliferation und der zunehmenden Differenzierung der unbestrahlten Fibroblasten eine Akkumulation von p53 und eine Zunahme der Expression von p21 beobachtet (Abbildung 4.7, S. 54). Die zelluläre Proteinmenge an p53 erhöhte sich dabei etwa 90 Tage vor der Zunahme der p21-Expression auf das Doppelte des Anfangswerts und blieb über den restlichen Beobachtungszeitraum unverändert. Die Expression von p21 blieb zunächst während der Akkumulation von p53 auf in etwa dem gleichen Niveau, stieg aber gleichzeitig mit dem Stillstand der Proliferation an und blieb danach in etwa gleich. Die Expression von p16

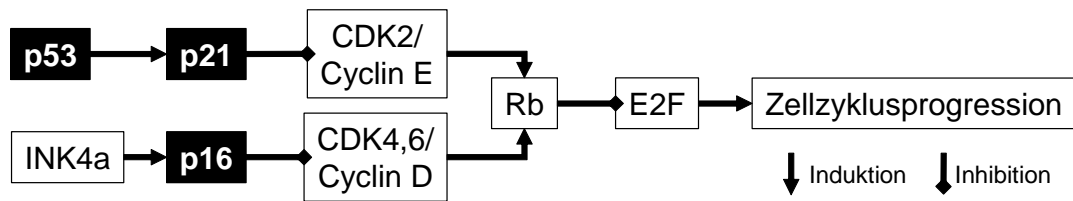


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Regulation der Zellzyklusprogression am G_0/G_1 -Kontrollpunkt.

stieg dagegen nicht an und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum im Bereich des zu Beginn der Kultivierung beobachteten Niveaus.

Die während der Entwicklung der Fibroblasten aufgetretene Akkumulation von p53 ging mit einer Verlangsamung der Verdopplungsrate einher, die auf eine Inhibition der Zellzyklusprogression schließen lässt. Da es innerhalb der Gesamtpopulation weiterhin zu einem Anstieg der Zellzahl kam, trat die p53-Akkumulation vermutlich jeweils nur in einer Subpopulation der Fibroblasten auf, deren Teilungspotential zum beobachteten Zeitpunkt erschöpft war. Solange in der Gesamtpopulation eine Teilungsaktivität vorhanden war, wurde die Akkumulation von p53 jedoch nicht von einer beobachtbaren Zunahme der p21-Expression begleitet. Dies kann durch das regelmäßige Passagieren der Kultur erklärt werden, bei dem der Anteil der inhibierten Fibroblasten durch die Zunahme des Anteils proliferierender Zellen ausgedünnt wurde. Die Zellpopulation mit erhöhter p21-Expression hob sich deshalb nicht weit genug von der Proteinexpression der Gesamtpopulation ab, um im *Western-Blot* detektiert zu werden. Diese Einschätzung wird durch die zeitgleich mit dem Teilungsstillstand der Gesamtpopulation aufgetretenen deutlichen Zunahme der p21-Expression bestätigt: Nachdem die inhibierten Zellen nicht mehr durch proliferierende Zellen ausgedünnt wurden, konnte ihre erhöhte p21-Expression detektiert werden. Die p21-Expression blieb in der darauf folgenden Zeit unverändert und es kam zu keiner weiteren Proliferation der Fibroblasten.

Eine umfassende Beteiligung des CDK-Inhibitors p16 am Übergang zur zellulären Seneszenz lässt sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen in AG 1522 Fibroblasten nicht belegen. Zwar ist analog zu den Betrachtungen zur p21-Expression hier ebenfalls eine Ausdünnung von inhibierten Zellen mit erhöhter p16-Expression denkbar, jedoch nahm die Expression von p16 beim Übergang in die zelluläre Seneszenz nicht zu. Auch mehrere Wochen nach dem Stillstand der Proliferation konnte keine Zunahme der p16-Expression beobachtet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Entwicklung der Fibroblasten am Ende ihrer Lebensspanne deutet darauf hin, dass der Zellzyklusarrest beim Eintritt in die zelluläre Seneszenz primär durch p53 und p21 reguliert wird. Eine Erhöhung der p16-Expression über den bei jungen Fibroblasten gemessenen Wert konnte im Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden, auch mehr als 56 Tage nach dem Stillstand der Proliferation trat weder eine Zunahme der p16-Expression noch eine Abnahme der p21-Expression auf (Abbildung 4.7, S. 54). Stein u. a. (1999) beobachteten bei embryonalen Lungenfi-

Tabelle 5.1: Veränderung der Proteinexpression beim Übergang in die Seneszenz.

Untersuchung	Ursprung der Fibroblasten	p53	p21	p16
Dulic u. a. (2000)	embryonal, Lunge	+	++	+
Itahana u. a. (2003)	embryonal, Lunge			++
Stein u. a. (1999)	embryonal, Lunge		+	++
Wei und Sedivy (1999)	embryonal, Lunge		++	++
Alcorta u. a. (1996)	embryonal/fötal, Lunge		+	+
Brookes u. a. (2004)	embryonal/fötal, Lunge		+	++
Alcorta u. a. (1996)	neonatal, Vorhaut		++	+
Beausejour u. a. (2003)	neonatal, Vorhaut		++	o
Bond u. a. (1999)	neonatal, Vorhaut		++	+
Brookes u. a. (2004)	neonatal, Vorhaut		+	o
Gire und Wynford-Thomas (1998)	neonatal, Vorhaut		++	
Itahana u. a. (2003)	neonatal, Vorhaut			o
Vorliegende Arbeit	neonatal, Vorhaut	++	++	o

Veränderung der Expression: (o) unverändert, (+) leichte Zunahme, (++) deutliche Zunahme

broblasten eine Zunahme der p16-Expression, die gleichzeitig von einer Abnahme der p21-Expression begleitet wurde. Die in dieser Hinsicht unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch zwei wesentliche Faktoren erklären: Stein u. a. (1999) verwendeten embryonale Lungenfibroblasten, die in vergleichbaren Experimenten eine deutliche p16-Expression gezeigt haben (Itahana u. a. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden dagegen neonatale Vorhautfibroblasten verwendet, bei denen in anderen Arbeiten häufig eine schwache p16-Expression beobachtet wurde (Tabelle 5.1, Itahana u. a. 2003; Beausejour u. a. 2003; Alcorta u. a. 1996). Diese unterschiedliche Entwicklung der p16-Expression im Abhängigkeit vom Zell-Ursprung könnte durch die Aktivität antioxidativer Enzyme verursacht werden: Bei adulten und neonatalen Hautfibroblasten sind die antioxidativen Enzyme aktiver als bei embryonalen Lungenfibroblasten (Serra u. a. 2003). Hinzu kommt, dass oxidativer Stress zur Ausprägung eines seneszenz-ähnlichen Phänotyps und zur Expression von p16 (Chen u. a. 2004) führt, beides jedoch durch Kultivierung bei niedrigem Sauerstoff-Partialdruck oder durch die Zugabe von Antioxidantien abgeschwächt werden kann (Lee u. a. 1999).

Weiterhin kultivierten Stein u. a. (1999) die Fibroblasten zwar in einer ähnlichen Zelldichte wie in den Experimenten dieser Arbeit, ersetzten innerhalb der 14 Tage jedoch nur ein Mal das Kulturmedium. Sie beobachteten dabei, dass die Zellen ihre Proliferation bereits vor dem Zeitpunkt der nächsten Passage auf Grund mangelnder Nährstoffversorgung eingestellt hatten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Kulturmedium dagegen innerhalb von 14 Tagen drei Mal gewechselt und die Zellen hatten zum Zeitpunkt der

Passage ihre Proliferation nach Erreichen der Kontaktinhibition eingestellt. Ein seltener Austausch des Kulturmediums bedeutet, dass die Fibroblasten den von ihnen abgegebenen Stoffwechselprodukten und Faktoren über längere Zeit ausgesetzt waren, was zur Beschleunigung ihrer Entwicklung beitragen kann (Übersicht in: Krtolica und Campisi 2002). Das Kulturmedium enthält außerdem neben Nährstoffen auch Bestandteile, die eine antioxidative Wirkung haben (z.B. Albumin, Ascorbinsäure, Folsäure) deren Verbrauch bei seltenerem Austausch zu einem höheren oxidativen Stress führen könnten (Murakami u. a. 1992; Goncharova u. a. 1996; Leist u. a. 1996; Rosenblatt u. a. 1998; Iglesias u. a. 1999). Bei Ramirez u. a. (2001) wurde beim Kultivieren von neonatalen Hautfibroblasten mit reduzierter Serumkonzentration (0,45 %) eine deutlichen Zunahme der p16-Expression beim Stillstand der Proliferation beobachtet. Die gleichen Zellen zeigten jedoch keine p16-Expression, wenn sie mit normaler Serumkonzentration (10 %) kultiviert wurden.

Der Zusammenhang zwischen p53, p21, p16 und der zellulären Seneszenz wurde in mehreren Arbeiten an verschiedenen Fibroblasten-Zell-Linien während ihrer Alterung untersucht. Das Spektrum der dabei erhaltenen Ergebnissen macht deutlich, dass neben dem Alter der Zellpopulation auch der Ursprung der untersuchten Fibroblasten einen großen Einfluss hat (Itahana u. a. 2003; Brookes u. a. 2004). So wurde bei seneszenten neonatalen humanen Vorhautfibroblasten (BJ/HCA2, NHF1) ein erhöhter zellulärer Gehalt an p53 und eine erhöhte p21-Expression beobachtet (Gire und Wynford-Thomas 1998; Bond u. a. 1999), jedoch keine (Beausejour u. a. 2003) oder nur eine gering erhöhte Expression von p16 (Alcorta u. a. 1996; Wei und Sedivy 1999). Bei fötalen und embryonalen Lungenfibroblasten wurde dagegen mit dem Eintritt in die zelluläre Seneszenz eine deutliche Zunahme der p16-Expression beobachtet, die bei der gleichen Zell-Linie (IMR-90) von einer mehr (Dulic u. a. 2000) oder weniger (Alcorta u. a. 1996) starken p21-Expression begleitet wurde.

Die genauen Mechanismen, die zur Induktion und Aufrechterhaltung der zellulären Seneszenz führen, sind noch in der Diskussion. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Gewichtung zwischen den p53-p21-Rb und p16-Rb-Signalkaskaden durch die vorliegende Kombination von Stressfaktoren geprägt wird und so zu einer der Situation entsprechenden komplexen und für die Zell-Linie typischen Reaktion führt (Ben-Porath und Weinberg 2005). Nach diesem Modell wird die Inhibition der Zellzyklusprogression parallel über die Signalwege p53-p21-Rb und p16-Rb reguliert. Dieses Modell wird durch Ergebnisse von Herbig u. a. (2004) unterstützt, die beim Eintritt embryonaler Lungenfibroblasten in die zelluläre Seneszenz beobachteten, dass die Expression von p21 und p16 auf Einzelzellebene unabhängig voneinander zunahm und selten gleichzeitig auftrat. Es steht auch im Einklang der Beobachtung von Sarsour u. a. (2005), dass die p16-Expression zunimmt, wenn Fibroblasten über längere Zeit (ca. 60 Tage) konfluent gehalten werden und dabei unabhängig von der Proliferation und der p21-Expression ist. Dem steht ein lineares Modell gegenüber, nach dem zuerst durch Induktion von p21 die Zellzyklusprogression gestoppt und danach durch Induktion von p16 aufrecht erhalten wird (Stein u. a. 1999).

Hinsichtlich der Bedeutung von p16 bei der Induktion und Aufrechterhaltung der zellulären Seneszenz gibt es demnach kontroverse Deutungen: Wei u. a. (2003) und Brown u. a. (1997) haben an embryonalen Lungen- und Hautfibroblasten gezeigt, dass jeweils der Verlust von funktionellem p53, p21 oder Rb bei präseneszenten Fibroblasten zur Umgehung der zellulären Seneszenz führt und den Fibroblasten eine deutlich verlängerte Lebensspanne ermöglicht, die nicht in der Seneszenz sondern in einem Zustand der Krise endet. Die Unterdrückung der p16-Funktion bewirkte jedoch im Vergleich dazu nur eine minimale Verlängerung der Lebensspanne, die weiterhin mit zellulärer Seneszenz endete. Bond u. a. (2004) haben dagegen nach dem Ausschalten der p16-Funktion durch kurze interferierende RNA (siRNA) bei seneszenten neonatalen Hautfibroblasten (BJ/HCA2) eine erhöhte BrdU-Inkorporation beobachtet und schließen daraus, dass p16 für den Eintritt in die zelluläre Seneszenz notwendig ist. Da sie jedoch nur eine niedrige Transfektionsrate von 5 % erreichten, gilt diese Schlussfolgerung möglicherweise nur für einen Teil der Population.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass der Stillstand der Proliferation am Ende der Lebensspanne und der darauf folgende Eintritt in die zelluläre Seneszenz bei AG1522 Fibroblasten primär durch die Akkumulation von p53 und die zunehmende Expression von p21 ausgelöst wird. Der CDK-Inhibitor p16 spielt auch über diesen Zeitpunkt hinaus keine herausragende Rolle, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass er unter veränderten Kultivierungsbedingungen einen größeren Einfluss ausüben könnte.

5.1.4 Schlussfolgerung: Merkmale der zellulären Seneszenz

Die Untersuchung der zellulären Seneszenz der AG 1522 Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit ergab ein Bild, dass weitgehend den Beobachtungen anderer Arbeiten entsprach. Die Fibroblasten durchliefen eine für diesen Zelltyp *in-vitro* zu erwartende begrenzte Anzahl an Populationsverdopplungen, wonach sie ihre Teilungsaktivität einstellten und sich ihr Zellvolumen vergrößerte. Die Verdopplungsrate der Fibroblasten-Population ging während der Kultivierung kontinuierlich zurück, gleichzeitig nahm der Anteil höher differenzierter Fibroblasten und, im geringen Umfang, der Anteil an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität zu. Beim Stillstand der Proliferation befand sich der größte Teil der Fibroblasten im letzten mitotischen Differenzierungsstadium (MF III), eine Weiterentwicklung in postmitotische Differenzierungsstadien wurde nicht beobachtet. Der Stillstand der Proliferation ging dabei mit einer Akkumulation von p53 und zunehmenden Expression von p21 einher, eine gesteigerte Expression von p16 wurde zumindest bei der Initiierung der zellulären Seneszenz nicht beobachtet.

Diese Ergebnisse bekräftigen ein Modell, bei dem die replikative Seneszenz wiederholt subkultivierter Fibroblasten primär durch die p53-p21-Signalkaskade gesteuert wird. Eine Hauptursache für die Aktivierung von p53 ist die Schädigung der DNA. Im Falle der replikativen Seneszenz wird die Verkürzung oder Dysfunktion der Telomerstruktur als ein Grund für das Auftreten von DNA-Schadenssignalen diskutiert (Übersicht in: Ben-Porath und Weinberg 2004).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Expression von p16 für den Eintritt unbestrahlter Fibroblasten in die replikative Seneszenz nicht zwingend notwendig. Die in anderen Arbeiten beobachtete Expression von p16 deutet aber darauf hin, dass p16 ein parallel induzierbarer Mechanismus ist, der ebenfalls zur replikativen Seneszenz führt. In welchem Umfang dieser Signalweg ausgelöst wird, hängt wahrscheinlich von zell- und kultivierungs-spezifischen Faktoren ab: Verschiedenen Fibroblasten-Linien haben eine unterschiedliche Fähigkeit oxidativen Stress zu kompensieren (Serra u. a. 2003) und exprimieren beim Übergang in die replikative Seneszenz mehr oder weniger große Mengen von p16-Protein (Chen u. a. 2004). Daneben können ungünstige Kultivierungsbedingungen einen seneszenten Phänotyp auslösen, der unabhängig vom replikativen Alter der Zellen ist und bei dem es zur Expression von p16 kommt (Übersicht: Shay und Wright 2005). Der p16-Signalweg ist demnach möglicherweise ein zusätzlicher Mechanismus, der im Falle ungünstiger Bedingungen einen beschleunigten Übergang in die replikative Seneszenz auslöst.

5.2 Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

Die im vorherigen Abschnitt diskutierten typischen Kennzeichen für die zelluläre Seneszenz von AG 1522 Fibroblasten dienen im weiteren Verlauf als Grundlage für die Bewertung der Fibroblasten-Entwicklung nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen. Während der Entwicklung der Fibroblasten konnten mehrere umfassende Änderungen beobachtet werden, zur besseren Abgrenzung der dazwischen liegenden Phasen wurde die Diskussion daher in drei Abschnitte aufgeteilt.

5.2.1 Phase I: Bestrahlte Fibroblasten und ihre Nachkommen

Im Folgenden werden die im Zeitraum von wenigen Wochen nach der Bestrahlung beobachteten Veränderungen der Proliferation, Differenzierung und Proteinexpression diskutiert und mit deren Entwicklung bei unbestrahlten Fibroblasten verglichen.

5.2.1.1 Zellzyklusinhibition nach Bestrahlung

Die Untersuchung von strahleninduzierten Veränderungen der Zellzyklusprogression wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Hoechst-BrdU-Quenching und BrdU-Markierung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.1, S. 35). Die Fibroblasten befanden sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus. Die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen führte bei einem Teil der Zellen zur Inhibition ihrer Zellzyklusprogression, diese Zellen traten innerhalb von 3 Tagen nach der Bestrahlung nicht in die S-Phase ein, sondern blieben in der G_0/G_1 -Phase (Abbildung 4.9, S. 57 und Abbildung 4.10, S. 58). Dieser Anteil dauerhaft inhibierter Zellen nahm bei beiden Strahlenqualitäten mit steigender Dosis zu, er war jedoch bei gleichen applizierten

Dosen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen höher als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (Abbildung 4.11, S.59). Die Untersuchungen ergaben für die relative biologische Wirksamkeit von dicht ionisierenden Kohlenstoff-Ionen ($\text{LET} = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$) gegenüber locker ionisierenden Röntgenstrahlen ($\text{LET} = 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$) bei 70 % inhibierten Zellen eine RBW von 4,1.

Einfluss der Dosis

Die in der vorliegenden Arbeit nach Bestrahlung beobachtete Dosisabhängigkeit der Zellzyklusinhibition bei AG 1522 Fibroblasten deckt sich sehr gut mit den Beobachtungen von Nasonova u. a. (2004), die mit der gleichen Zell-Linie und unter den gleichen Bedingungen ebenfalls einen mit der Dosis steigenden Anteil dauerhaft inhibierter Zellen feststellten. Einen dosisabhängig zunehmenden Anteil inhibierter Zellen beobachteten Di Leonardo u. a. (1994) und Linke u. a. (1997) bei normalen humanen Fibroblasten auch nach Bestrahlung mit locker ionisierenden γ -Photonen. Die dabei ermittelten Anteile inhibierter Zellen entsprechen in ihrer Systematik den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Die Ursache für den mit der Dosis zunehmenden Anteil inhibierter Zellen ist die dabei zunehmende strahleninduzierte Schädigung der DNA. Röntgenstrahlung erzeugt in jeder bestrahlten humanen Zelle etwa 20–40 DNA-Doppelstrangbrüche pro Gray applizierter Dosis (Übersicht in: Prise u. a. 1998). Da die in dieser Arbeit applizierten Dosen Röntgenstrahlen im Bereich von 2 Gy bis 16 Gy lagen, wurden somit in jeder bestrahlten Zelle eine Vielzahl an Doppelstrangbrüchen erzeugt. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen erfolgt in der G_0/G_1 -Phase überwiegend durch den NHEJ-Mechanismus, bei dem offene DNA-Enden miteinander verknüpft werden (Übersicht in: Sonoda u. a. 2006). Die Prozessierung der Doppelstrangbrüche findet dabei innerhalb weniger Stunden nach der Bestrahlung statt. Nach einer hinreichend erfolgreich verlaufenen Wieder-Verknüpfung können Zellen die Proliferation wieder aufnehmen. Die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Verknüpfung der Doppelstrangbrüche, die keine weitere Proliferation erlaubt, nimmt mit ihrer Anzahl und der applizierten Dosis zu, was zu einer dosisabhängigen Zunahme des Anteils inhibierter Zellen führt.

Einfluss der Strahlenqualität

Die höhere Inhibitions-Effektivität der dicht ionisierenden Kohlenstoff-Ionen gegenüber den locker ionisierenden Röntgenstrahlen wird auf die hohe lokale Energiedeposition innerhalb ihrer Teilchenspur zurückgeführt (Krämer und Kraft 1994), die zu einer höheren Komplexität der DNA-Schäden und verringerten Reparierbarkeit führt (Taucher-Scholz u. a. 1996; Hoglund und Stenerlow 2001; Hirayama u. a. 2005). Unreparierte Doppelstrangbrüche sind ein Auslöser für die Inhibition der Zellzyklusprogression (Übersicht in: Olive 1998).

Nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen war der Anteil proliferierender Zellen bei Detektion mittels dauerhafter BrdU-Markierung gleich groß, wenn die applizierte Do-

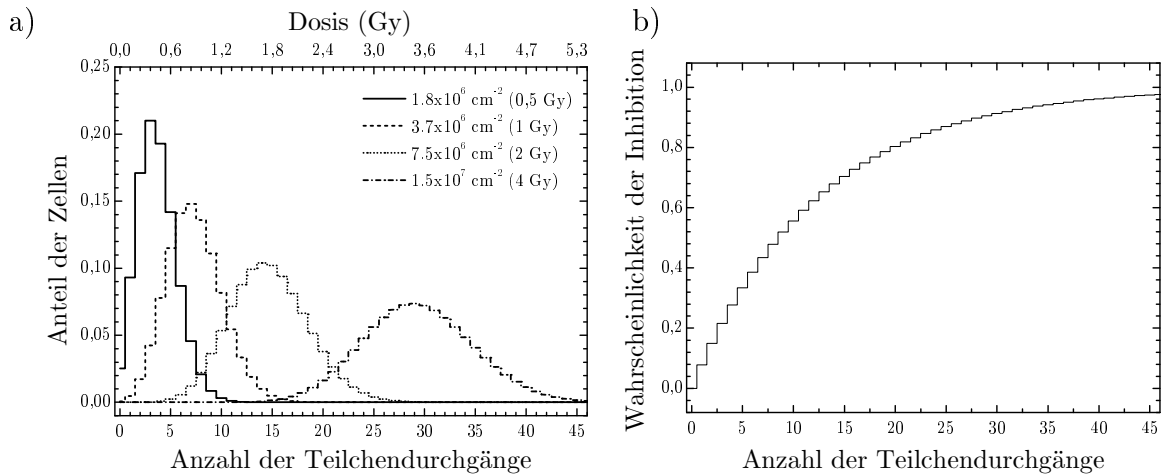


Abbildung 5.3: (a): Verteilung der Anzahl an Teilchendurchgängen (Treffer) pro Fibroblasten-Zellkern bei den verwendeten Teilchenfluenzen. (b): Angenommene Wahrscheinlichkeit für die Inhibition einer Zelle in Abhängigkeit von der Anzahl an Teilchendurchgängen.

sis der Kohlenstoff-Ionen etwa viermal kleiner als die der Röntgenstrahlen war (Abbildung 4.9, S. 57). Die Detektion proliferierender Zellen mittels Puls-Markierung nach 5 und 19 Tagen ergab jedoch, dass der Anteil proliferierender Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen größer war als nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen (Abbildung 4.12, S. 60). Im Gegensatz zu den dauerhaft mit BrdU kultivierten Fibroblasten konnten die ohne BrdU kultivierten Zellen bis zur Puls-Markierung unbeeinflusst von der BrdU-induzierten Zellzyklusinhibition proliferieren (Berger 2001). Der bei der Puls-Markierung gemessene höhere Anteil proliferierender Zellen in den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen ist demnach ein Hinweis darauf, dass sich diesen Kulturen ein größerer Anteil schnell proliferierender Zellen befand als in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen.

Die beim Anteil initial inhibierter Zellen und dem Anteil zu späteren Zeiten proliferierender Zellen zwischen Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen vorliegende Diskrepanz lässt sich durch die physikalischen Eigenschaften beider Strahlenqualitäten erklären. In Abbildung 5.3a werden Treffer-Verteilungen für die in dieser Arbeit verwendeten Teilchenfluenzen von Kohlenstoff-Ionen gezeigt. Als Zielfläche wurde die durchschnittliche Fibroblasten-Kernfläche von 226 μm^2 gewählt (Abbildung 4.2, S. 47). Aus den Verteilungen lässt sich ablesen, dass sich die mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen aus mehreren Subpopulationen zusammensetzen, die von einer unterschiedlichen Anzahl an Teilchen getroffen wurden. Die nach 3 Tagen beobachteten Anteile proliferierender Zellen lassen sich mittels eines Modells berechnen, wenn man eine Wahrscheinlichkeit von 8 % annimmt, dass ein einzelner Teilchendurchgang zur Inhibition der Zellzyklusprogression führt. Abbildung 5.4a zeigt die Faltung der POISSON-Verteilungen (Abbildung 5.3a) mit der Inhibitions-Wahrscheinlichkeit (Abbildung 5.3b) und stellt die nach verschiedenen Zahlen von Teilchendurchgängen noch proliferierenden Subpopulationen dar. Die

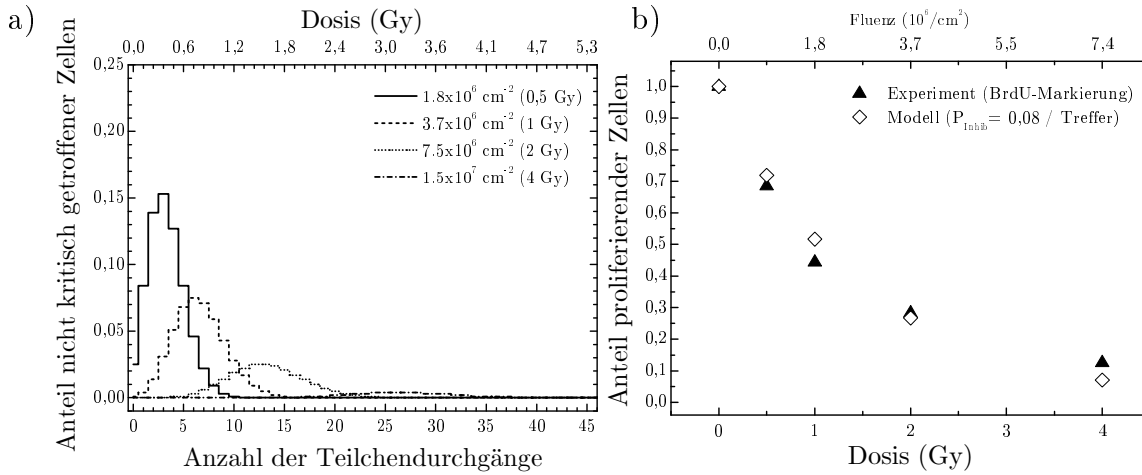


Abbildung 5.4: (a): Zu erwartender Anteil nicht kritisch getroffener (d. h. proliferierender) Fibroblasten in Abhängigkeit von der Anzahl an Teilchendurchgängen und der Wahrscheinlichkeit einer Inhibition. Die Fläche unter der jeweiligen Kurve entspricht dem bei dieser Teilchenfluenz zu erwartenden Gesamtanteil proliferierender Zellen. (b): Vergleich der gemessenen Anteile proliferierender Zellen mit den bei einer Inhibitions-Wahrscheinlichkeit von 0,08 pro Teilchendurchgang zu erwartenden Werten.

nach Gleichung 5.1 berechnete Summe dieser Subpopulationen, d. h. der Gesamtanteil proliferierender Zellen, wird in Abbildung 5.4b gezeigt und deckt sich gut mit den experimentellen Ergebnissen. Aus diesem Modell lässt sich schließen, dass es bei Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen nur dann zur Inhibition der Zellzyklusprogression kommt, wenn beim Durchgang des Teilchens kritische Zellkern-Strukturen geschädigt werden, die 8 % des Zellkerns ausmachen.

$$P_{A,F} = \sum_{n=0}^{\infty} 0,92^n \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}, \text{ mit } \lambda = AF \quad (5.1)$$

- P : Anteil proliferierender Zellen
- n : Trefferzahl
- A : Fläche des Zellkerns
- F : Teilchenfluenz

Im Unterschied zu den Kohlenstoff-Ionen sind diese kritischen Strukturen bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen auf Grund der homogenen Dosisverteilung immer mit betroffen. Die homogene Dosisverteilung bewirkt jedoch auch eine homogene Verteilung der DNA-Schäden auf kritische und unkritische Strukturen. Deshalb wird für einen gleich großen Effekt wie nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen eine höhere Dosis benötigt. Die mit der Zeit aufgetretene Zunahme des Anteils proliferierender Zellen bei den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen lässt sich ebenfalls durch die heterogene

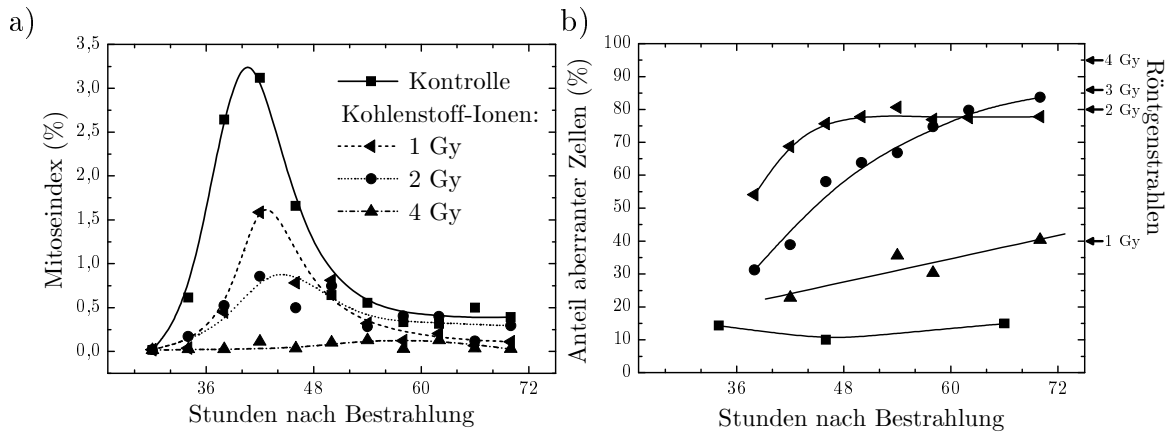


Abbildung 5.5: Entwicklung des Mitoseindex und des Anteils aberranter Zellen nach Kohlenstoff-Bestrahlung ($LET = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$). **(a):** Der Anteil an Zellen, innerhalb von 72 Stunden nach der Bestrahlung die Mitose erreichen nimmt mit steigender Dosis ab. **(b):** Der Anteil aberranter Zellen ist in den mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen kleiner als in der mit 1 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Population. Im Gegensatz dazu steigt der Anteil aberranter Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen kontinuierlich mit der Dosis an (die Pfeile zeigen die mittlere Anzahl aberranter Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen). Daten aus Winter (2002) und Nasonova u. a. (2004).

Dosisverteilung und das Vorhandensein einer kritischen Struktur erklären: Die nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen teilungsaktiven Zellen proliferierten, weil ihre kritische Struktur nicht oder nur gering geschädigt wurde. Die nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen teilungsaktiven Zellen proliferierten dagegen, obwohl ihre kritischen Strukturen geschädigt wurden. Auch wenn diese Schäden so weit behandelt wurden, dass die Zellen zur Proliferation fähig waren, ist vorstellbar, dass die mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber vorhandenen Stressfaktoren (z. B. reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), Kultivierungsbedingungen) zeigten und langsamer proliferierten als die nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen proliferierenden Zellen. Rückschlüsse auf Eigenschaften der kritischen Zellkern-Struktur lassen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ziehen, denkbar ist jedoch, dass es sich bei den kritischen Strukturen um wichtige strukturelle Komponenten des Chromatins wie z. B. spezifische chromosomale Territorien (Telomere, Bereiche mit hoher Gendichte) handelt, die nur einen geringen Anteil des Chromatins darstellen.

Daten aus zytogenetischen Experimenten, die in früheren Arbeiten durchgeführt wurden sprechen dafür, dass die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen die Selektion gering geschädigter Zellen begünstigt (Winter 2002). Abbildung 5.5a zeigt, dass der Anteil proliferierender Zellen mit steigender Dosis abnimmt. Gleichzeitig nimmt jedoch mit steigender Dosis auch der Anteil aberranter Zellen ab (Abbildung 5.5b). Im Gegensatz dazu steigt der Anteil aberranter Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen kontinuierlich an (Nasonova u. a. 2004). Die geringere Schädigung der verbleibenden proliferierenden Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen ist daher wahrscheinlich für deren schnell-

lere Angleichung an die Kontrolle verantwortlich.

Die nach Bestrahlung mit Iso-Dosen beobachtete höhere Effektivität der Kohlenstoff-Ionen ($LET = 170 \text{ keV}/\mu\text{m}$) gegenüber Röntgenstrahlen wurde am gleichen Zellsystem auch von Berger (2001) festgestellt, die Werte für die relative biologische Wirksamkeit lagen dabei nach dauerhafter BrdU-Markierung in einem ähnlichen Bereich ($RBE = 4,1$ in der vorliegenden Arbeit, $RBE = 4,3$ bei Berger (2001)). Eine bei dicht ionisierender Strahlung gegenüber locker ionisierender Strahlung höheren Effektivität beobachteten auch Gadbois u. a. (1996) und Azzam u. a. (2000) bei der Analyse des Anteils inhibierter juveniler bzw. neonataler Hautfibroblasten nach Bestrahlung, aus den veröffentlichten Daten lässt sich für α -Teilchen ($LET = 124 \text{ keV}/\mu\text{m}$) gegenüber γ -Strahlung eine etwa 5-fach höhere Effektivität berechnen.

Einfluss von Faktoren im Kulturmedium

Der Anteil inhibierter Zellen nahm nach Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlen ab, wenn das BrdU-haltige Kulturmedium täglich oder in mehrtägigem Abstand ausgetauscht wurde (Abbildung 4.8, S. 56). Zu Beginn der Langzeit-Untersuchungen wurde ebenfalls beobachtet, dass der Anteil inhibierter Zellen in den mit Röntgenstrahlen und – weniger deutlich – in den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen abnahm, nachdem das Kulturmedium am vierten Tag ausgetauscht wurde. Der Anteil inhibierter Zellen nahm dabei in den mit hohen Dosen bestrahlten Populationen weniger ab als in den mit niedrigen Dosen bestrahlten Populationen. Diese Ergebnisse bedeuten, dass Zellen, die bereits in der G_0/G_1 -Phase inhibiert waren, in Folge des Mediumaustauschs in die S-Phase eintraten.

Der Einfluss der Häufigkeit des Mediumaustauschs auf den Anteil dauerhaft inhibierter Zellen wurde bisher nur in einer Arbeit nach Bestrahlung mit γ -Strahlen von DeSimone u. a. (2000) untersucht. Sie beobachteten innerhalb von 7 Tagen nach Bestrahlung juveniler Vorhautfibroblasten eine größere Zunahme der Zellzahl, wenn das Medium täglich ausgetauscht wurde. Sie beobachteten weiterhin, dass die Zellzyklusprogression zwar bei einem überwiegenden Anteil der Zellen dauerhaft inhibiert war, jedoch ein kleiner Teil der Zellen (etwa 10 % bei 4 Gy) nach einem Austausch des Kulturmediums in der Lage war, in den Zellzyklus einzutreten.

Eine wahrscheinliche Ursache für die Wiederaufnahme der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung ist, dass durch den Mediumaustausch Faktoren entfernt werden, die die Zellzyklusprogression inhibieren. Die Existenz derartiger Faktoren wird durch mehrere Arbeiten untermauert, in denen das Kulturmedium bestrahlter Fibroblasten zur Induktion von Zellzyklusinhibitoren bei unbestrahlten Fibroblasten führte (Coates u. a. 2004; Yang u. a. 2005; Fournier u. a. 2007).

5.2.1.2 Vorübergehender Rückgang der Proliferation

Die durchschnittliche Verdopplungsrate der Zellen wurde nach jeder Passage aus der Zunahme der Zellzahl errechnet. Bei der ersten Passage nach der Bestrahlung war die

Verdopplungsrate der bestrahlten Kulturen mit steigender Dosis niedriger als bei der Kontrollpopulation (Abbildung 4.13, S. 61). Im Laufe der folgenden Passagen nahm die Verdopplungsrate in den mit ursprünglich 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen jedoch wieder auf das Niveau der Kontrolle zu. Die Zunahme der Verdopplungsrate trat in den ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Kulturen früher auf als in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen. In der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kultur war die Proliferation über einen längeren Zeitraum niedriger als in den anderen Kulturen.

Die Entwicklung der Verdopplungsrate bei den bestrahlten Populationen spiegelt die Inhibition der Zellzyklusprogression wider. Der Anteil inhibierter Zellen nahm mit der Dosis zu. Bei den folgenden Subkultivierungen wurden die inhibierten Zellen gegenüber den proliferierenden Zellen ausgedünnt, der zunehmende Anteil teilungsaktiver Zellen führte zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Verdopplungsrate. Die Proliferation der Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen erholte sich aus den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Gründen (geringere Schädigung kritischer Strukturen) schneller als die der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen.

Der Zusammenhang zwischen dem Rückgang des Anteils nach Bestrahlung inhibierter Zellen und der danach auftretenden Zunahme der Verdopplungsrate wurde bisher in keiner Arbeit mit ähnlichen Dosen und Strahlenqualitäten an normalen Fibroblasten beschrieben. Tsutsui u. a. (1997) beobachteten jedoch nach der Bestrahlung von p53-defizienten Li-Fraumeni-Fibroblasten mit einer einzelnen Dosis (4 Gy Röntgenstrahlen) ebenfalls einen Rückgang der Verdopplungsrate, die nach 100 Tagen wieder auf das Kontrollniveau zunahm.

5.2.1.3 Strahleninduzierte Differenzierung

Die Bestrahlung führte zu einer beschleunigten Differenzierung der Fibroblasten (Abbildung 4.14, S. 63), die dabei beobachtete morphologische Veränderung der Fibroblasten stimmte mit der Morphologie von *in-vitro* alternden Fibroblasten überein (Bayreuther u. a. 1988; Rodemann u. a. 1991). Der größte Teil der bestrahlten Zellen war nach 9 Tagen in das Stadium MF III und ein kleinerer Teil in das Stadium PMF übergegangen. Die Differenzierung zu MF III Fibroblasten war dabei primär von der Dosis abhängig, lediglich der PMF-Anteil zeigte eine Abhängigkeit von der Strahlenqualität. Die weitere Subkultivierung und die dabei auftretenden Effekte (Ausdünnung, niedrigere Proliferationsrate und Verlust der höher differenzierten Fibroblasten) führten dazu, dass bei den bestrahlten Kulturen der MF II-Anteil zu- und der MF III- und PMF-Anteil abnahm, wodurch der Unterschied zwischen der Kontrolle und den bestrahlten Kulturen mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung kleiner wurde.

Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Ausmaß der vorzeitigen Differenzierung nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von Experimenten überein, die mit der gleichen Zell-Linie unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden (Fournier u. a. 2001). In dieser Arbeit wurde

ebenfalls eine auf die Bestrahlung folgende vorzeitige Differenzierung beschrieben, dabei nahm der Anteil an MF III- und PMF-Fibroblasten auf Kosten des MF II-Anteils zu, der PMF-Anteil lag dabei im in der vorliegenden Arbeit beobachteten Bereich. Der Anteil an PMF-Fibroblasten war dabei ebenfalls in Abhängigkeit von der Strahlenqualität erhöht: Nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen wurde ein höherer Anteil postmitotischer Fibroblasten beobachtet als nach Bestrahlung mit der gleichen Dosis Röntgenstrahlen. Nach Bestrahlung mit Photonenstrahlung wurde auch bei der *in-vitro*-Kultivierung von Hautfibroblasten aus Biopsien adulter Spender (Lara u. a. 1996; Herskind und Rodemann 2000; Rave-Frank u. a. 2001) und bei Lungenfibroblasten aus der Ratte (Hakenjos u. a. 2000) eine Verschiebung des Differenzierungsmuster zu späten Differenzierungsstadien beobachtet.

Die durch ionisierende Strahlung induzierte vorzeitige Differenzierung wurde zuerst von Rodemann u. a. (1991) bei normalen humanen Hautfibroblasten beschrieben und auch von Dittmann u. a. (1995) unter ähnlichen Kultivierungsbedingungen beobachtet, der dabei beobachtete hohe Anteil postmitotischer Fibroblasten ist jedoch nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die Fibroblasten wurden in diesen Arbeiten im asynchronen Zustand bestrahlt, da sie ein bis 2 Tage vor der Bestrahlung in sehr niedriger Zelldichte (50 Zellen/cm²) ausgesät wurden. Möglicherweise können Fibroblasten strahleninduzierte Schäden in der S- und G₂-Phase schlechter verarbeiten als in der G₀/G₁-Phase, so dass sich die Wahrscheinlichkeit einer vorzeitigen Differenzierung erhöht.

Die Differenzierung der bestrahlten Fibroblasten deutet auf eine strahleninduzierte vorzeitige Alterung der Zellen hin, da die dabei beobachtete Zellmorphologie mit den späten Differenzierungsstadien *in-vitro* alternder Fibroblasten übereinstimmte. Dabei stellten die postmitotischen Fibroblasten in allen bestrahlten Kulturen den geringeren Anteil der Zellpopulation dar, der überwiegende Anteil der Population befand sich im MF III Stadium und war weiterhin teilungsaktiv. Die gegenüber der Kontrollpopulation weitgehende Differenzierung der Nachkommen der bestrahlten Zellen bedeutet, dass trotz der Wiederaufnahme der Proliferation Veränderungen vorhanden waren, die ihre Differenzierung beschleunigten.

5.2.1.4 Zunahme der Expression Zellzyklus-regulierender Proteine

Regulation von p53

Die Akkumulation von p53 und Zunahme der p21- und p16-Expression unterschied sich in den mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen (Abbildung 4.17, S. 66a). Die p53-Akkumulation war in den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen niedriger als in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen, das Maximum lag bei beiden Strahlenqualitäten zwischen 1 und 21 Tage nach der Bestrahlung.

Die Akkumulation von p53 direkt nach ionisierender Bestrahlung kommt in vielen

verschiedenen Zellsystemen vor (Übersicht in: Fei und El-Deiry 2003). Sie wurde in G_0/G_1 -synchronisierten AG 1522 und AG 1521 Hautfibroblasten im Zeitraum von bis zu 96 Stunden sowohl nach hoch-LET- als auch nach niedrig-LET-Bestrahlung beobachtet (Di Leonardo u. a. 1994; Azzam u. a. 2000; Fournier u. a. 2004). In diesen Arbeiten wurde zunächst zwischen 0 und 10 Stunden nach der Exposition eine deutliche Akkumulation von p53 beobachtet, die danach jedoch zunächst auf das Kontrollniveau zurückging und nach 24 Stunden wieder geringfügig zunahm. Der weitere Verlauf der p53-Akkumulation wurde bei G_0/G_1 -synchronisierter Fibroblasten bisher in keiner anderen Arbeit über mehr als 4 Tage nach der Bestrahlung untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete weitere Zunahme der Akkumulation von p53 wurde jedoch auch bei asynchron bestrahlten Fibroblasten im Zeitraum von bis zu 6 Tagen nach der Bestrahlung mit einem ähnlichen zeitlichen Verlauf beschrieben (DeSimone u. a. 2000). Die Abhängigkeit der p53-Akkumulation von der Dosis und Strahlenqualität zu späteren Zeitpunkten als 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde bisher in keiner Arbeit untersucht. Die p53-Akkumulation synchronisiert bestrahlter AG 1522 Fibroblasten war zwar 3 Stunden nach ihrer Bestrahlung sowohl von der Dosis als auch der Strahlenqualität abhängig (Fournier u. a. 2004) (Kohlenstoff-Ionen waren effektiver als Röntgenstrahlung), in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosisbereich trat jedoch bereits ein Sättigungseffekt auf, d. h. die p53-Akkumulation nahm nicht mehr linear mit der Dosis zu.

Für die Zellzyklus-inhibierende Funktion von p53 ist neben seiner Akkumulation auch seine post-translationale Modifizierung notwendig, bei der Phosphorylierungs- und Acetylierungsprozesse zur Stabilisierung von p53 in einem tetrameren Proteinkomplex führen, der schließlich die transaktivierende Funktion ausübt (Übersicht in: Lakin und Jackson 1999). Als Folge ionisierender Strahlung tritt bei p53 u. a. die Phosphorylierung der Serin-15 Seitenkette auf, wodurch die Interaktion mit dessen negativen Regulator MDM2 vermindert und die Transaktivierung stimuliert wird (Shieh u. a. 1997; Siliciano u. a. 1997; Canman u. a. 1998; Dumaz und Meek 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gegenüber der Kontrolle eine Zunahme der Serin-15-Phosphorylierung von p53 beobachtet, die 8 Tage nach der Bestrahlung bei allen bestrahlten Populationen etwa gleich groß war (Abbildung 4.18, S. 67). Die Zunahme der Serin-15-Phosphorylierung in Folge von ionisierender Strahlung wurde in ähnlicher Form auch in anderen Arbeiten beobachtet: Nach Bestrahlung von Fibroblasten mit 7–20 Gy γ -Strahlen nahm die Serin-15-Phosphorylierung von p53 bereits nach 1–4 Stunden zu (Stanchina u. a. 1998; Tibbetts u. a. 1999; Adamson u. a. 2002). Die Serin-15-Phosphorylierung wurde bei Fibroblasten zu späteren Zeiten als 18 Stunden nach Bestrahlung bisher nicht untersucht, daher existieren für die in der vorliegenden Arbeit zu späteren Zeitpunkten beobachtete erhöhte Serin-15-Phosphorylierung keine vergleichbaren Daten.

Die weitere Entwicklung der Serin-15-Phosphorylierung von p53 entsprach der Entwicklung der p53-Gesamtproteinmenge. In der mit 16 Gy bestrahlten Population blieb dagegen sowohl die p53-Akkumulation als auch die Serin-15-Phosphorylierung bis zu 35 Tage nach der Bestrahlung erhöht, obwohl zu diesem Zeitpunkt weniger als 10 % der Zellen zur ursprünglich bestrahlten Population gehörten.

Regulation von p21

Die direkt auf die Bestrahlung folgende Akkumulation und post-translationale Modifizierung von p53 induziert die Transaktivierung des p21-Gens und führt zur Zunahme der p21-Expression (Harper u. a. 1993; El-Deiry u. a. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die zeitliche Entwicklung der p21-Expression bei G₀/G₁-synchronisierten Hautfibroblasten nach der Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen untersucht. Die p21-Expression nahm gleichzeitig mit der Akkumulation von p53 zu (Abbildung 4.17b, S. 66).

Die Expression von p21 nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen wurde bei Fibroblasten bereits in mehreren Arbeiten beobachtet, die dabei untersuchten Zeiträume waren jedoch kürzer als in der vorliegenden Arbeit und es wurden andere Strahlenqualitäten und Kultivierungsbedingungen eingesetzt (Gadbois u. a. 1996, 1997; Dimitrijevic-Bussod u. a. 1999; Ghosh u. a. 2000; Tsuyama u. a. 2001, alle mit nicht-synchronisierten Fibroblasten).

Es gibt auch einige Arbeiten, in denen Fibroblasten unter ähnlichen Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden und bei denen die p21-Expression in ihrem zeitlichen Ablauf und ihrer Abhängigkeit von der Strahlenqualität eine ähnliche Systematik wie in der vorliegenden Arbeit zeigt: Die p21-Expression von AG 1522 Fibroblasten nahm bei Fournier u. a. (2004) nach der Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy und 16 Gy Röntgenstrahlen innerhalb von 5 Stunden zu und blieb bis 24 Stunden nach der Bestrahlung erhöht. Die Zunahme der p21-Expression war dabei von der Dosis und der Strahlenqualität abhängig (Iso-Dosen von Kohlenstoff-Ionen führten zu einer stärkeren Zunahme der p21-Expression als Röntgenstrahlen). Damit übereinstimmend beobachteten Di Leonardo u. a. (1994), DeSimone u. a. (2000) und Azzam u. a. (2000) bei synchronisiert bestrahlten Hautfibroblasten ebenfalls eine innerhalb von 5 Stunden auftretende und bis 96 Stunden anhaltende Zunahme der p21-Expression, dicht ionisierende Strahlen (α -Teilchen) hatten dabei eine höhere Effektivität als locker ionisierende Strahlen (γ -Strahlen). Die darüber hinaus gehende zeitliche Entwicklung der p21-Expression wurde bisher nur in einer Arbeit untersucht: Suzuki u. a. (2001) beobachteten bei asynchron bestrahlten humanen Embryozellen nach 24 Stunden eine stark erhöhte p21-Expression. Diese nahm zwar innerhalb von 10 Tagen nach der Bestrahlung ab, blieb aber deutlich über dem Niveau der unbestrahlten Zellen.

Die Untersuchung der p21-Expression auf Einzelzelebene bei mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten bestätigte die Systematik der *Western-Blot*-Untersuchungen, zeigt aber ein differenzierteres Bild (Abbildung 4.19, S. 68): Die p21-Expression unterschied sich zwischen den Zellen einer bestrahlten Population, bemerkenswerterweise existierte auch in den mit 8 Gy und 16 Gy bestrahlten Kulturen Zellen, deren p21-Expression sich nicht von der der Kontrolle unterschied. Suzuki u. a. (2001) haben in *Western-Blot*-Experimenten beobachtet, dass ein Rückgang der p21-Expression von einer Zunahme der p16-Expression begleitet wird. Da die p21- und p16-Expression in einzelnen Zellen nicht gleichzeitig untersucht wurde, besteht daher die Möglichkeit, dass Zellen mit niedriger p21-Expression eine erhöhte p16-Expression hatten und umgekehrt.

Eine andere Erklärung für die, trotz niedriger Expression der CDK-Inhibitoren, geringe Teilungsaktivität könnte eine Unterbrechung der Proliferation durch andere Prozesse sein: In differenzierten Geweben von Fibroblasten wird Kollagen XIV produziert, das ein starker Auslöser für die Quieszenz von Fibroblasten ist (Walchli u. a. 1994; Ruehl u. a. 2005). Da in der vorliegenden Arbeit die Bestrahlung zur Differenzierung eines Teils der Fibroblastenpopulation führte (Abbildung 4.14, S. 63), ist ein inhibierender Einfluss der dadurch veränderten Kultivierungsumgebung auf die Proliferation vorstellbar.

Regulation von p16

Die Induktion von p16, dem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4/6, wird durch verschiedene Arten von Stress (übersteigerte Wachstumssignale, sub-optimale Zellkulturbedingungen, DNA-Schädigung, Telomer-Dysfunktion) und beim Eintritt in die replikative Seneszenz ausgelöst (Übersicht in: Bringold und Serrano 2000; Ben-Porath und Weinberg 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung der p16-Expression in bestrahlten Fibroblasten im Hinblick auf die mögliche Beteiligung von p16 an der strahleninduzierten vorzeitigen Alterung der Fibroblasten untersucht. Die Zunahme der p16-Expression folgte zeitlich auf die Akkumulation von p53 und die Induktion von p21 (Abbildung 4.17c, S. 66). Zwischen der applizierten Dosis und der im Maximum nach 21 Tagen beobachteten p16-Expression bestand unter Berücksichtigung der experimentellen Schwankungen ein weitgehend linearer Zusammenhang.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den in anderen Arbeiten angedeuteten Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung und der Zunahme der p16-Expression: Die strahleninduzierte Zunahme der p16-Expression wurde bei Zellen der humanen amniotischen Flüssigkeit und bei hämatopoietischen Zellen der Maus nach Bestrahlung mit γ -Strahlen beobachtet (Lange u. a. 2004; Meng u. a. 2003). Eine der Zunahme der p53-Akkumulation und p21-Expression folgende p16-Expression wurde auch bei (Suzuki u. a. 2001) nach der Bestrahlung asynchroner humaner embryonaler Fibroblasten gefunden. Daneben ähnelt der in der vorliegenden Arbeit beobachtete zeitliche Verlauf der p16-Expression dem Verlauf bei Fibroblasten, die mit einer Doppel- und Einzelstrangbruch-auslösenden Chemikalie (Bleomycin) behandelt wurden Robles und Adami (1998). Ähnlich zur vorliegenden Arbeit wurde bei *in-vitro* bestrahlten kultivierten Vorhäuten keine früh auftretende p16-Expression beobachtet Pavey u. a. (1999).

Ähnlich zur p21-Expression bestätigte die p16-Expression auf Einzelzellebene die Systematik der *Western-Blot*-Untersuchungen (Abbildung 4.19, S. 68). Auch hier existierten in den mit 8 Gy und 16 Gy bestrahlten Populationen Zellen, deren p16-Expression sich nicht von der der Kontrolle unterschied.

Zusammenhang zwischen Proteinexpression und Differenzierung

Die Untersuchung der Proteinexpression auf Einzelzellebene zeigte außerdem, dass die p21- und p16-Expression bei unbestrahlten Zellen mit dem Differenzierungsgrad der Zellen zunahm (Abbildung 5.6). Die Bestrahlung mit 16 Gy Röntgenstrahlen führte dazu, dass die p21-Expression der mitotischen Fibroblasten zunahm, während sie bei den post-

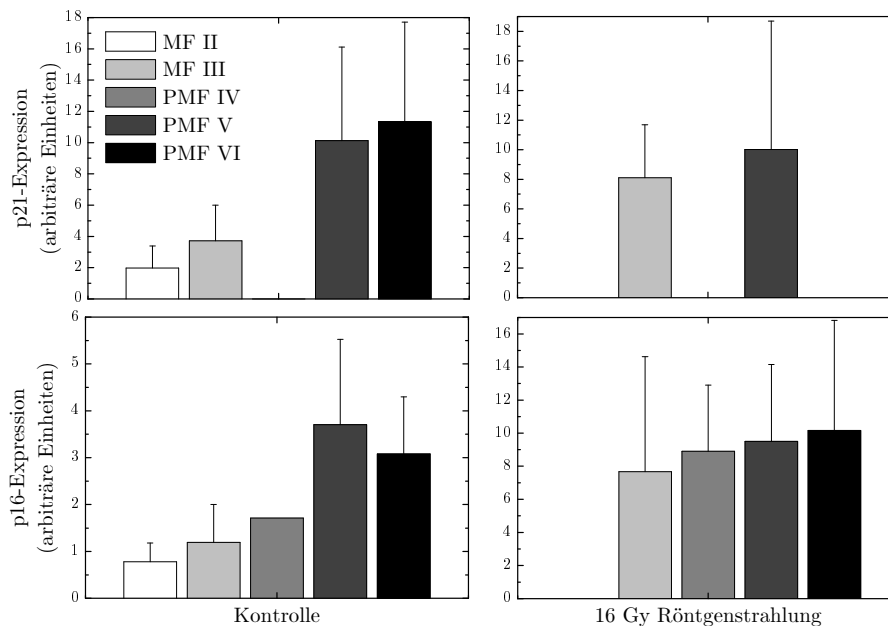


Abbildung 5.6: Durchschnittliche p21- und p16-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium, 9 Tage nach Bestrahlung. Daten aus Experiment „2/06“. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen den einzelnen Zellen wieder.

mitotischen Fibroblasten unverändert hoch blieb. Die Zunahme der p21-Expression ging demnach nicht zwangsläufig mit der Differenzierung der Fibroblasten in postmitotische Zellen einher. Die p16-Expression erhöhte sich in Folge der Bestrahlung bei den verschiedenen Differenzierungsstadien ebenfalls auf ein ähnlich hohes Niveau, jedoch war die p16-Expression nach der Bestrahlung insgesamt deutlich höher als in den unbestrahlten Zellen. Die nach Bestrahlung nur noch schwache Korrelation zwischen CDK-Inhibitor-Expression und Differenzierungsgrad deutet darauf hin, dass die Induktion von p21 und p16 innerhalb von Tagen nach der Bestrahlung nicht unbedingt an die postmitotische Differenzierung der Fibroblasten gekoppelt ist.

5.2.1.5 Zusammenfassung: Phase I

Die Bestrahlung von Fibroblasten mit Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlen führte zu einer vorzeitigen Alterung eines Teils der bestrahlten Population, die Gemeinsamkeiten mit der bei unbestrahlten Fibroblasten am Ende ihrer Lebensspanne auftretenden Alterung hatte: Durch die Bestrahlung kam es zur Inhibition der Zellzyklusprogression und in der Folge zu einem Rückgang der Proliferation. Die Zunahme des Anteils an Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität entsprach dem bei seneszenten Kontrollzellen beobachteten Umfang. Gleichzeitig nahm die Aktivität von p53 und die Expression von p21 zu, es kam zu einem verstärkten Übergang in spätere Differenzierungsstadien. Das Ausmaß dieser vorzeitigen Alterung nahm mit der Dosis zu und war von der Strahlen-

qualität abhängig. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es innerhalb des Zellkerns eine kritische Struktur gibt, deren Schädigung zu einem der natürlichen Alterung ähnlichen Bild führen. Diese kritische Struktur wurde zwar nicht bei jedem Durchgang eines Kohlenstoff-Ions getroffen, wurde aber im Falle eines Treffers auf Grund der hohen lokalen Dosisdeposition sehr stark geschädigt. Die homogene Dosisverteilung der Röntgenstrahlen führte dagegen dazu, dass die kritische Struktur zwar immer getroffen wurde, aber es erst bei höheren Dosen zu einer der Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen entsprechenden Reaktion kam. In den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen existierten demnach Zellen, deren kritische Strukturen wenig oder nicht getroffen waren und die ungestört proliferieren konnten. Die kritischen Strukturen der Zellen in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen waren dagegen global geschädigt, was wahrscheinlich zu einer Verlangsamung der Teilungsgeschwindigkeit führte.

Auffällig ist, dass es nur in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen 3 Wochen nach der Exposition zu einer deutlichen Expression von p16 kam. Die gleichzeitig beobachtete niedrige Proliferation dieser Populationen deutet darauf hin, dass dabei Zellen ihre Teilungsaktivität über die Aktivierung von Signalwegen verloren, die zur Expression von p16 führten. In diesem Punkt unterscheidet sich die Reaktion der Fibroblasten auf Bestrahlung von der normalen Alterung der unbestrahlten AG 1522 Fibroblasten, bei denen die Induktion von p16 nicht beobachtet wurde. Möglicherweise beruht die Induktion von p16 bei den Fibroblasten, die trotz der Bestrahlung mit hohen Dosen von Röntgenstrahlen zunächst noch proliferieren konnten, auf der homogenen Dosisverteilung und der damit einher gehenden umfassenden Schädigung kritischer und unkritischer Strukturen.

5.2.2 Phase II: Intermediäre Entwicklung der Nachkommen

5.2.2.1 Proliferation

Die Proliferation der ursprünglich bestrahlten Populationen hatte nach etwa 40 Tagen zugenommen (Abbildung 4.21, S. 72). In den folgenden 50 Tagen unterschied sich die zwischen den Subkultivierungen ermittelte Zellzahl der ursprünglich bestrahlten Populationen nicht von der Kontrolle, danach nahm die Proliferation jedoch in den ursprünglich bestrahlten Kulturen schneller ab als in der Kontrollpopulation. Der Rückgang der Proliferation war dabei bei den ursprünglich mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen gleich groß, d. h. unabhängig von der applizierten Dosis und Strahlenqualität. Eine Ausnahme stellte die ursprünglich mit 16 Gy bestrahlte Population dar, in ihr war die Proliferation vom Bestrahlungszeitpunkt bis 120 Tage nach der Bestrahlung durchgehend niedriger als die der Kontrolle.

Einzelne Punkte der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Entwicklung der bestrahlten Fibroblasten wurden auch in anderen Arbeiten beschrieben. Tsutsui u. a. (1997) beobachteten bei normalen Fibroblasten nach neunmaliger täglicher Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlen zunächst einen Rückgang und danach eine Zunahme der Proliferation. Ergänzend dazu beobachteten Laublin u. a. (1979), dass Populationen von fötalen

Lungenfibroblasten nach γ -Bestrahlung eine geringere Lebensspanne hatten.

Die Angleichung der Proliferation der Kontrolle und der ursprünglich mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen beruht auf der Ausdünnung der langsam proliferierenden Zellen durch die wiederholten Subkultivierungen: Nach jeder Passage nahm die Zahl der schneller proliferierenden Zellen stärker zu als die Zahl der langsam proliferierenden Zellen. Die Folge dieser Selektion war, dass sich sowohl die Kontrollpopulation als auch die ursprünglich bestrahlten Populationen zum überwiegenden Teil aus den teilungsaktivsten Zellen zusammensetzten. Da die Proliferation zwischen den Subkultivierungen jedoch durch die zur Verfügung stehende Wachstumsfläche begrenzt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proliferation der Nachkommen der bestrahlten Populationen niedriger war als die der Kontrollpopulation. Die vorzeitig auftretende Abnahme der Proliferation bedeutet, dass die Nachkommen der bestrahlten Zellen eine von der Kontrollpopulation unterschiedliche Entwicklung durchlaufen. Die Unabhängigkeit dieser Entwicklung von der Dosis und Strahlenqualität deutet darauf hin, dass nach unterschiedlicher Bestrahlung ähnliche Subpopulationen selektiert wurden.

Dass die Proliferation der nach Bestrahlung nicht inhibierten Zellen dazu führte, dass sie ihre maximale Lebensspanne früher erreichten lässt sich als Erklärung für den vorzeitigen Stillstand der Proliferation rechnerisch ausschließen: Der Rückgang der Proliferation bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen trat sieben Populationsverdopplungen früher auf als in der Kontrollpopulation (PD 17 gegenüber PD 24), selbst ein totaler Verlust der nach Bestrahlung inhibierten Zellen (maximal 88 % bei 4 Gy Kohlenstoff-Ionen) wäre jedoch bereits durch 1–3 zusätzliche Verdopplungen der verbleibenden Zellen regeneriert worden (Gleichung 5.2). Außerdem hätte in diesem Fall die Kompensation des dosisabhängigen Anteils inhibierter Zellen am Anfang der Kultivierung zu einem dosisabhängigen Rückgang der Proliferation am Ende ihrer Lebensspanne führen müssen.

$$PD_R = -\frac{\ln p_p}{\ln 2} \quad (5.2)$$

PD_R : Zur Regeneration benötigte Verdopplungen
 p_p : Anteil proliferierender Zellen

Die dauerhaft niedrige Proliferationsrate der Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen bedeutet, dass sich in dieser Population keine Zellen befanden, die eine ähnlich hohe Verdopplungsrate wie die Kontrollzellen hatten. Aus der Entwicklung der Zellzahl lässt sich berechnen, dass die mit ursprünglich 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Kultur nach mehr als 4 Passagen zu über 90 % aus Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen bestand (Abbildung 5.7). Das bedeutet, dass die niedrige durchschnittliche Teilungsgeschwindigkeit eine Eigenschaft der Nachkommen der bestrahlten Zellen ist und nicht durch die noch vorhandenen ursprünglich bestrahlten Zellen verursacht wird.

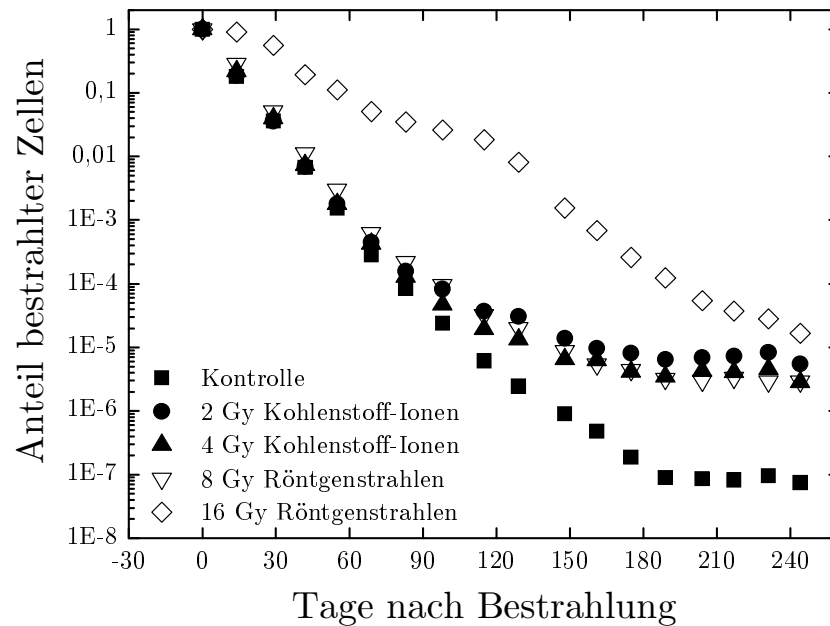


Abbildung 5.7: Ausdünnung der ursprünglich bestrahlten Zellen durch die Nachkommen der proliferierenden Zellen. Mit jeder Subkultivierung (Datenpunkte) ging der Anteil der ursprünglich bestrahlten Population an der Gesamtpopulation zurück.

5.2.2.2 Differenzierung

Das Differenzierungsmuster der Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen hatte sich nach etwa 40 Tagen weitgehend der Kontrolle angeglichen (Abbildung 4.22, 73). Diese Entwicklung erfolgte zeitgleich mit der im vorherigen Teil beschriebenen zunehmende Proliferation. Die Subkultivierung führte dabei zur Ausdünnung der kurz nach Bestrahlung noch vorhandenen höher differenzierten Zellen, die Ursache dafür könnte ihre geringere Teilungsgeschwindigkeit oder ihr selektiver Verlust bei der Passage sein. Das Differenzierungsmuster von Fibroblasten ist bisher in keiner anderen Arbeit über mehr als 21 Tage nach ihrer Bestrahlung verfolgt worden.

Zwischen 70 und 100 Tagen setzte bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen ein Rückgang der Proliferation ein, der von einer leichten Verschiebung des Differenzierungsmuster zu späteren Stadien begleitet wurde: Der Anteil an MF II Zellen nahm gegenüber der Kontrolle ab, der Anteil MF III und postmitotischer Fibroblasten zu (Abbildung 4.22, 73). Das Differenzierungsmuster der ursprünglich mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen entsprach dabei dem der Kontrollpopulation zu späteren Zeiten. Im Unterschied zu diesen Populationen befanden sich die Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen im gleichen Zeitraum durchgehend in einem fortgeschritteneren Differenzierungsstadium, das sich durch einen hohen Anteil an PMF auszeichnete, der während der gesamten Kultivierung in keiner der anderen Po-

pulationen beobachtet wurde. Die Nachkommen der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Zellen trugen demnach strahleninduzierte Veränderungen in sich, die erst nach mehreren Zellteilungen zu einer verzögert auftretenden und sich von der Kontrollpopulation unterscheidenden Differenzierung führten.

5.2.2.3 Proteinexpression

Zwischen 40 und 100 Tage nach der Bestrahlung unterschied sich die Expression von p53, p21 und p16 bei den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nicht von der der Kontrollpopulation (Abbildung 4.25, S. 76). Die Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p16 nahm jedoch ab 100 Tage nach der Bestrahlung wieder zu. Dabei zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Dosis oder Strahlenqualität. Die Expression von p53, p21 und p16 ist bisher in keiner anderen Arbeit über mehr als 14 Tage nach ihrer Bestrahlung verfolgt worden.

Die bei der Kontrollpopulation und den Nachkommen der bestrahlten Zellen gleichartige Expression der Zellzyklus-inhibierenden Proteine steht im Einklang mit der zur gleichen Zeit beobachteten ähnlichen Proliferationsrate und dem ähnlichen Differenzierungsmuster. Die nach etwa 100 Tagen auftretende Zunahme der Expression von p21 und p16 führte bei einem Teil der Zellen zum Stillstand der Proliferation und erklärt die gleichzeitig beobachtete Abnahme der Verdopplungsrate. Die Entwicklung war dabei unabhängig von der ursprünglich applizierten Dosis und Strahlenqualität, was darauf hin deutet, dass die Subpopulationen, die die Gesamtentwicklung der Population nach Bestrahlung bestimmten, ähnliche Eigenschaften hatten. Trotz der Zunahme der p21-Expression kam es bei diesen Zellen nicht zur Akkumulation von p53, möglicherweise wurde die Zunahme der p21-Expression jedoch durch eine Zunahme der p53-Aktivität induziert. So konnte z.B. bei den mit 16 Gy bestrahlten Fibroblasten nach 35 Tagen beobachtet werden, dass ihre niedrige Verdopplungsrate mit einer erhöhten Serin-15-Phosphorylierung von p53 einher ging, obwohl die p53-Akkumulation nur geringfügig über der der Kontrollzellen lag (Abbildung 4.18, S. 67).

Die Proteinexpression der Nachkommen der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Zellen unterschied sich von den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen und der Kontrollpopulation: Die Akkumulation von p53 und die Expression von p16 nahm zu, die p21-Expression nahm jedoch ab. Die zunehmende Akkumulation von p53 und Expression von p16 zu diesem Zeitpunkt deutet darauf hin, dass Nachkommen der bestrahlten Zellen ihre Teilungsaktivität spontan einstellten. Dies deckt sich mit der gleichzeitig beobachteten, relativ zur Kontrolle niedrigen Proliferation und dem hohen Anteil postmitotischer Fibroblasten. Die Inhibition der Zellzyklusprogression findet bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen demnach primär über die Induktion von p16 statt.

5.2.2.4 Zusammenfassung: Phase II

Hinsichtlich der untersuchten Endpunkte, dem Proliferationsverhalten, dem Differenzierungsmuster und der Expression der Zellzyklus-regulierenden Proteine zeigten die Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten zunächst die gleichen Eigenschaften wie die Kontrollzellen. Da zur Untersuchung dieser Endpunkte jedoch immer Massenkulturen über lange Zeiträume kultiviert wurden, spielen die während der Subkultivierung auftretenden Selektionseffekte eine große Rolle. Die zu späteren Zeiten untersuchten Populationen zeigen daher keinen repräsentativen Querschnitt der ursprünglich bestrahlten Zellpopulation. Trotz der Bevorzugung der proliferierenden Zellen zeigten sich mit zunehmender Zeit deutliche Unterschiede zwischen den Nachkommen der bestrahlten Zellen und den Kontrollzellen. Die Induktion von Zellzyklus-Inhibitoren führte zu einem Rückgang der Proliferation und einer Verschiebung des Differenzierungsmusters zu höheren Differenzierungsstadien. Diese Veränderungen waren bei den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen unabhängig von der Dosis und Strahlenqualität, was darauf hindeutet, dass nach der Bestrahlung Subpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften selektiert wurden.

5.2.3 Phase III: Spätentwicklung der Nachkommen

5.2.3.1 Proliferation

Die Proliferation der Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nahm bis zum vollständigen Stillstand des Populationswachstums 190 Tage nach Bestrahlung stetig ab (Abbildung 4.26, S. 78). Im Gegensatz dazu blieb die Proliferation der Kontrollpopulation während dieser Zeit unverändert, sie verlor erst zwischen 190 und 205 Tagen nach der Bestrahlung ihre Teilungsaktivität. Der Verlust der Teilungsaktivität manifestierte sich bei der Kontrollpopulation relativ schnell zwischen lediglich zwei Passagen, während er sich bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen über mehr als 5 Passagen erstreckte.

Auf Grund der natürlichen Alterung der Fibroblasten *in-vitro* war zu erwarten, dass sich die Kontrollzellen und die Nachkommen der bestrahlten Zellen nur über einen begrenzten Zeitraum teilen und danach in die replikative Seneszenz übergehen. Bei der Kontrollpopulation entsprach der Zeitpunkt des Stillstands der Proliferation und die dabei erreichte Zahl der Verdopplungen den in anderen Arbeiten beobachteten Werten (siehe Abschnitt 5.1). Der gegenüber der Kontrollpopulation vorzeitig und langsamer eintretende Übergang in den Teilungsstopp bei den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Kulturen zeigt eine in diesen Zellen verzögert auftretende Wirkung der ursprünglichen Bestrahlung. Der gegenüber der Kontrolle langsamere Rückgang der Verdopplungsrate kann dadurch ausgelöst worden sein, dass ein zunehmender Teil der Zellen die Teilungsfähigkeit verliert, oder sich die Teilungsgeschwindigkeit der Gesamtpopulation zunehmend verlangsamt. Möglicherweise trat auch ein höherer Zellverlust auf, in einem Folgeexperiment wurde bei den Nachkom-

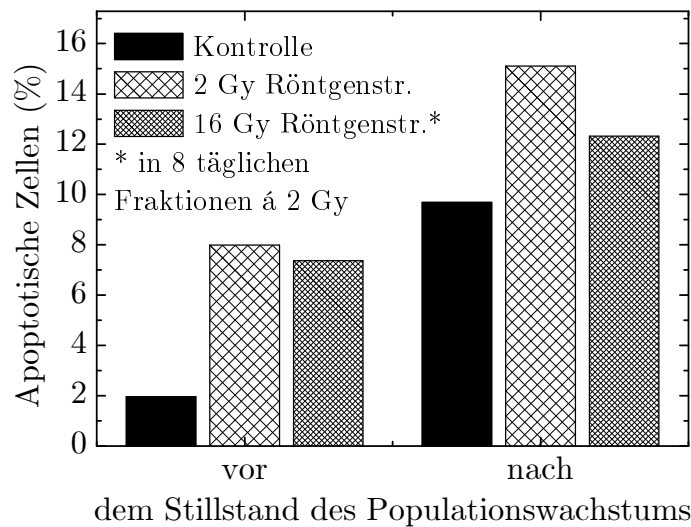


Abbildung 5.8: Der Anteil apoptotischer Zellen war in den Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten vor und nach dem Stillstand des Populationswachstums höher als in der unbestrahlten Population. (Nach: Zahnreich und Ritter 2006)

men von mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen beobachtet (Abbildung 5.8). Der Auslöser für den Rückgang der Proliferation war unabhängig von der ursprünglich applizierten Dosis und Strahlenqualität, da bei Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen ihre Teilungsaktivität zur gleichen Zeit einstellten.

Bei den Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen war besonders auffallend, dass die Proliferation der Population 130 Tage nach der Bestrahlung plötzlich sehr deutlich zunahm und die der Kontrollpopulation sogar übertraf. Diese Zellen blieben außerdem länger teilungsaktiv als die Zellen der Kontrollpopulation und die Nachkommen der anderen bestrahlten Populationen. Die unerwartete Zunahme der Proliferation lässt sich mit der Neuentstehung einer Subpopulation erklären, deren Teilungsgeschwindigkeit größer als die der bereits vorhandenen Zellen war. Die höhere Teilungsgeschwindigkeit dieser Zellen führte dazu, dass die Kultur nach wenigen Passagen nur noch aus Zellen dieses Typs bestanden. Die Teilungsaktivität blieb jedoch nicht dauerhaft erhöht und die Fibroblasten waren nicht immortalisiert.

5.2.3.2 Differenzierung

Die Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten und die Kontrollpopulation enthielten vor und nach dem Stillstand der Proliferation überwiegend Zellen im MF III-Stadium (Abbildung 4.27, S. 79). Nach dem Stillstand der Proliferation unterschieden sich die Nachkommen der bestrahlten Zellen von der Kontrollpopulation durch leicht erhöhten Anteil postmitotischer Fibroblasten. Die Zunahme der postmitotischen Fibroblasten deu-

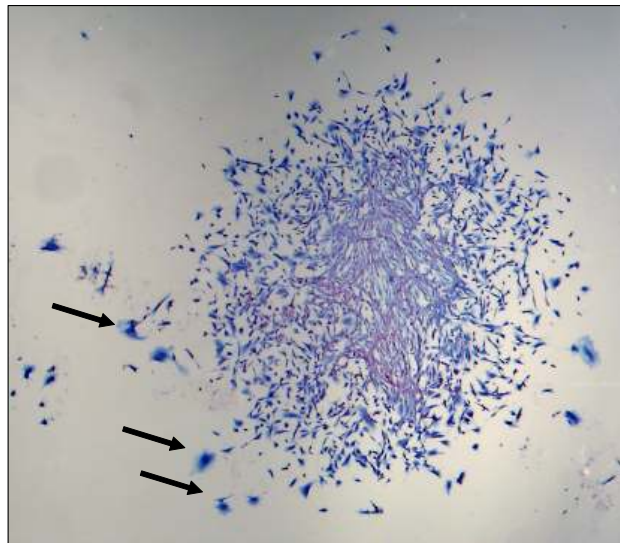


Abbildung 5.9: Morphologische Färbung von Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen, 130 Tage nach der Bestrahlung. Neben einzelnen postmitotischen Fibroblasten (Pfeile) existierten auch besonders aktive Zellen, die sich in den 14 Tagen zwischen Aussaat und Färbung oft teilten und Kolonien bildeten. Die abgebildete Kolonie enthält etwa 1200 Zellen, was 10 Verdopplungen der Ursprungszelle entspricht.

tet zusammen mit dem Stillstand der Proliferation auf eine vorzeitige terminale Differenzierung eines Teils der Fibroblasten hin. Der größte Teil der Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen beendete seine Teilungsfähigkeit jedoch nicht im postmitotischen Stadium sondern, wie auch die Kontrollzellen, als MF III-Fibroblasten. Der bei den Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen gegenüber den Kontrollen erhöhte Anteil postmitotischer Fibroblasten bedeutet zwar, dass in dieser Population trotz der hohen Proliferationsaktivität mehr Zellen terminal differenzierten als in der Kontrollpopulation, zeigt aber auch, dass die Proliferation der verbleibenden mitotischen Fibroblasten stark genug war, um den Verlust der PMF zu kompensieren (Abbildung 5.9).

5.2.3.3 Proteinexpression

Die p53-Proteinmenge nahm in den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen beim Übergang in den Stillstand der Proliferation gegenüber der Kontrolle nicht zu. Dies lässt mehrere Schlussfolgerungen hinsichtlich der Rolle zu, die p53 beim Stillstand der Proliferation einnimmt: Da die Expression von p21 nicht nur über die p53-Akkumulation, sondern auch über die p53-Aktivität gesteuert wird, wird der vorzeitige Stillstand der Proliferation möglicherweise durch einen erhöhten aktiven p53-Anteil ausgelöst. Die Untersuchung der Serin-15-Phosphorylierung von p53 kurz vor dem Stillstand der Proliferation zeigte jedoch bei den Nachkommen der mit 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten

Zellen keine erhöhte Menge an Serin-15-phosphoryliertem p53 (Abbildung 4.31, S. 83).

Die vor dem Stillstand der Proliferation zunehmende p21-Expression bei den Nachkommen der mit 2 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen zeigt jedoch, dass die Induktion von p21 am Proliferationsstopp beteiligt ist. Die kurz darauf folgende Abnahme der relativen p21-Expression lässt sich dadurch erklären, dass die p21-Expression in der Kontrollpopulation gleichzeitige stark und dauerhaft zunahm (Abbildung 4.7, S. 54). Demnach ist p21 sowohl an der Einleitung als auch an der Aufrechterhaltung des Stillstands der Proliferation beteiligt, unabhängig davon, ob es sich um Nachkommen der bestrahlten Zellen oder Kontrollzellen handelt. Neben p21 spielt bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen jedoch wahrscheinlich auch die p16-Expression eine Rolle, da sie bei ihnen vor dem Stillstand des Populationswachstums deutlich zunahm. Hinsichtlich der Rolle von p16 bei der Aufrechterhaltung des Stillstands der Proliferation deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf einen Einfluss der Strahlenqualität hin: Bei den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen blieb die p16-Expression auch über den Stillstand der Proliferation hinaus erhöht. Bei den Nachkommen der mit 8 Gy bestrahlten Zellen ging die p16-Expression dagegen nach dem Stillstand der Proliferation zurück.

Die Entwicklung der Proteinexpression war bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen besonders auffällig und unterschied sich in ihrer Systematik deutlich von den Kontrollen und den Nachkommen der anderen bestrahlten Zellen (Abbildung 4.30, S. 82): Es kam zu einer sehr deutlichen Akkumulation von p53, gleichzeitig nahm jedoch die p21-Expression drastisch ab und parallel dazu die p16-Expression deutlich zu. Zu einem späteren Zeitpunkt gingen die p53-Akkumulation und die p16-Expression nach dem Erreichen eines Maximums zurück, parallel dazu erreichte die p21-Expression wieder Kontrollwerte.

Die deutliche Zunahme der p53-Menge bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen führte demnach nicht zu einer Zunahme der p21-Expression, obwohl ein großer Teil des p53 Serin-15-phosphoryliert, d. h. aktiviert, vorlag. Die p21-Expression blieb sogar weit unterhalb der Expression in der Kontrollpopulation. Die Zunahme der p53-Menge und -Aktivierung und der p16-Expression führte außerdem nicht zu einem Stillstand der Proliferation. Zusammengefasst deutet die Proteinexpression der Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen stark auf einen Defekt in der Signaltransduktion zwischen p53-Aktivierung und p21-Expression hin.

5.2.3.4 Genetische Instabilität bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen

Zur Untersuchung der genetischen Stabilität der Nachkommen der bestrahlten Zellen wurden Chromosomenaberrationen in Metaphase-Zellen untersucht. Die dazu notwendigen Proben wurden während des Experiments entnommen und von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ausgewertet. Dabei wurde unter anderem der Anteil an aberranten Zellen und die durchschnittliche Anzahl an Aberrationen pro Zelle bestimmt. Das Kriterium für eine aberrante Zelle war dabei das Vorliegen von Chromatid- und Chromosomenbrü-

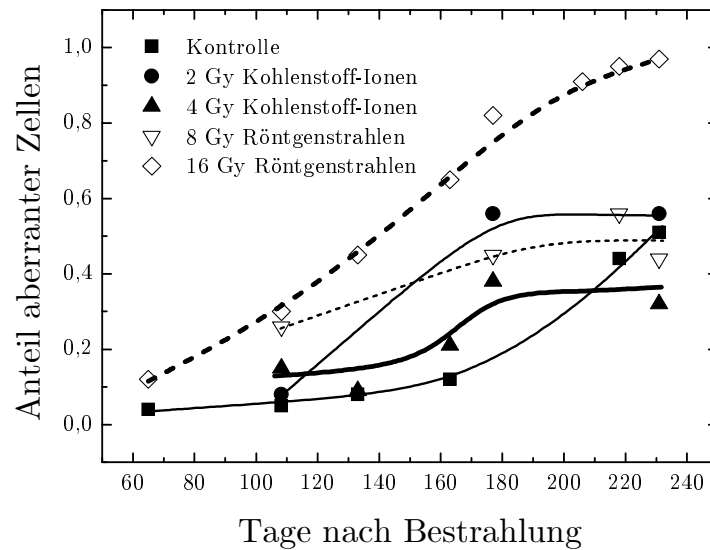


Abbildung 5.10: Anteil aberranter Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung. Die Präparate wurden mit GIEMSA-Lösung gefärbt. Bei den Nachkommen der mit 2 Gy und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen und 8 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen entwickelte sich der Anteil aberranter Zellen ähnlich wie in der Kontrollpopulation. Bei den Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen nahm der Anteil aberranter Zellen kontinuierlich zu (Nach: Nasonova 2006).

chen, dizentrischen Ring-Chromosomen und Chromatidtyp-Austausche.

Der Anteil aberranter Zellen war in der Kontrollpopulation bis zum Stillstand des Populationswachstums niedrig, nahm aber danach deutlich zu (Abbildung 5.10). Bei den Nachkommen der bestrahlten Zellen nahm der Anteil aberranter Zellen dagegen schon früher zu, die Werte blieben aber später im Bereich der Kontrollpopulation. Eine Ausnahme davon waren die Nachkommen der mit 16 Gy bestrahlten Zellen, in dieser Population nahm der Anteil aberranter Zellen bei gleich bleibender Teilungsaktivität kontinuierlich auf nahezu 100 % zu.

Die Zunahme des Anteils aberranter Zellen fiel mit der Abnahme der Proliferation zusammen. Die Abnahme des Populationswachstums führte dazu, dass nur noch die letzten teilungsaktiven Zellen untersucht wurden. Unter diesen wenigen Metaphasen waren aberrante Zellen zwar überrepräsentiert, da die Gesamtzellzahl der Population aber auch über längere Zeiträume nach dem Stillstand der Proliferation nicht zunahm, bedeuteten diese Aberrationen für die Zellen keinen Wachstumsvorteil.

Im Gegensatz dazu entstand in der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Population ein Aberrationstyp der offensichtlich einen großen Wachstumsvorteil bedeutete. Die Untersuchung der Chromosomen dieser Zellen nach 155 Tagen zeigte, dass bei über 80 % der Population der selbe Aberrationstyp vorkam (Abbildung 5.11). Bei einer genaueren Untersuchung des Karyotyps stellte sich heraus, dass diese Zellen unter anderem ein Chromosom 6 verloren hatten (Abbildung 5.12). Da das Gen für den CDK-Inhibitor p21 auf dem Chromosom 6 liegt, ist der Verlust dieses Chromosoms eine mögliche Erklärung

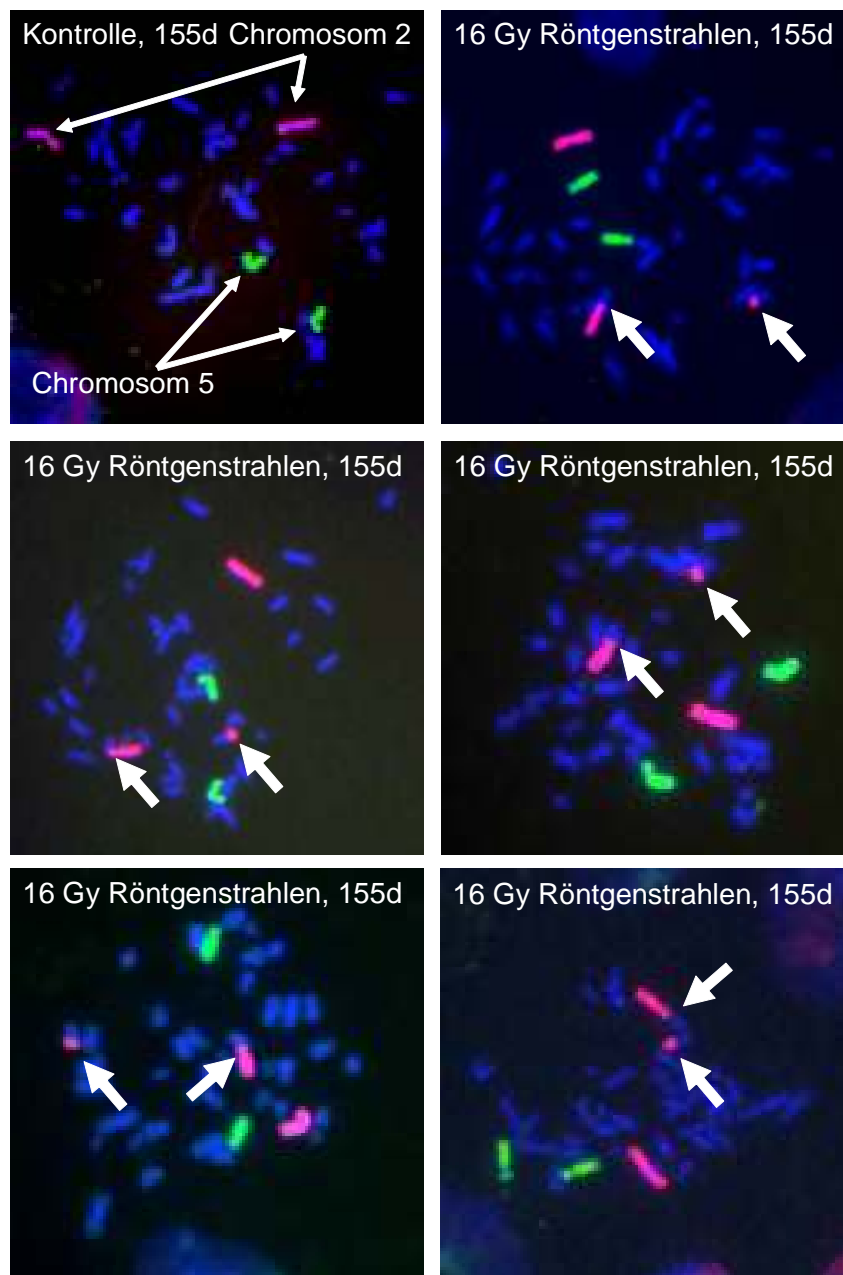


Abbildung 5.11: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) der Kontrollpopulation (1. Bild) und der Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Population (5 Bilder verschiedener Metaphasen), 155 Tage nach Bestrahlung. Die homologen Chromosomen 2 (rot) und 5 (grün) wurden spezifisch gefärbt und die übrigen Chromosomen mit DAPI gegengefärbt (blau). In der Kontrollpopulation waren jeweils zwei intakte Chromosomen 2 und 5 vorhanden. In den Metaphasen der Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen fand sich dagegen gehäuft (>80 % der Metaphasen) eine Translokation zwischen Chromosom A und einem weiteren, nicht extra angefärbten Chromosom (dicke Pfeile). Die Translokation trat dabei immer am selben Ort der Chromosomen auf, so dass hier von einem klonalen Ursprung der Zellen ausgegangen werden kann. (Präparation und Fotografie: Fournier 2006)

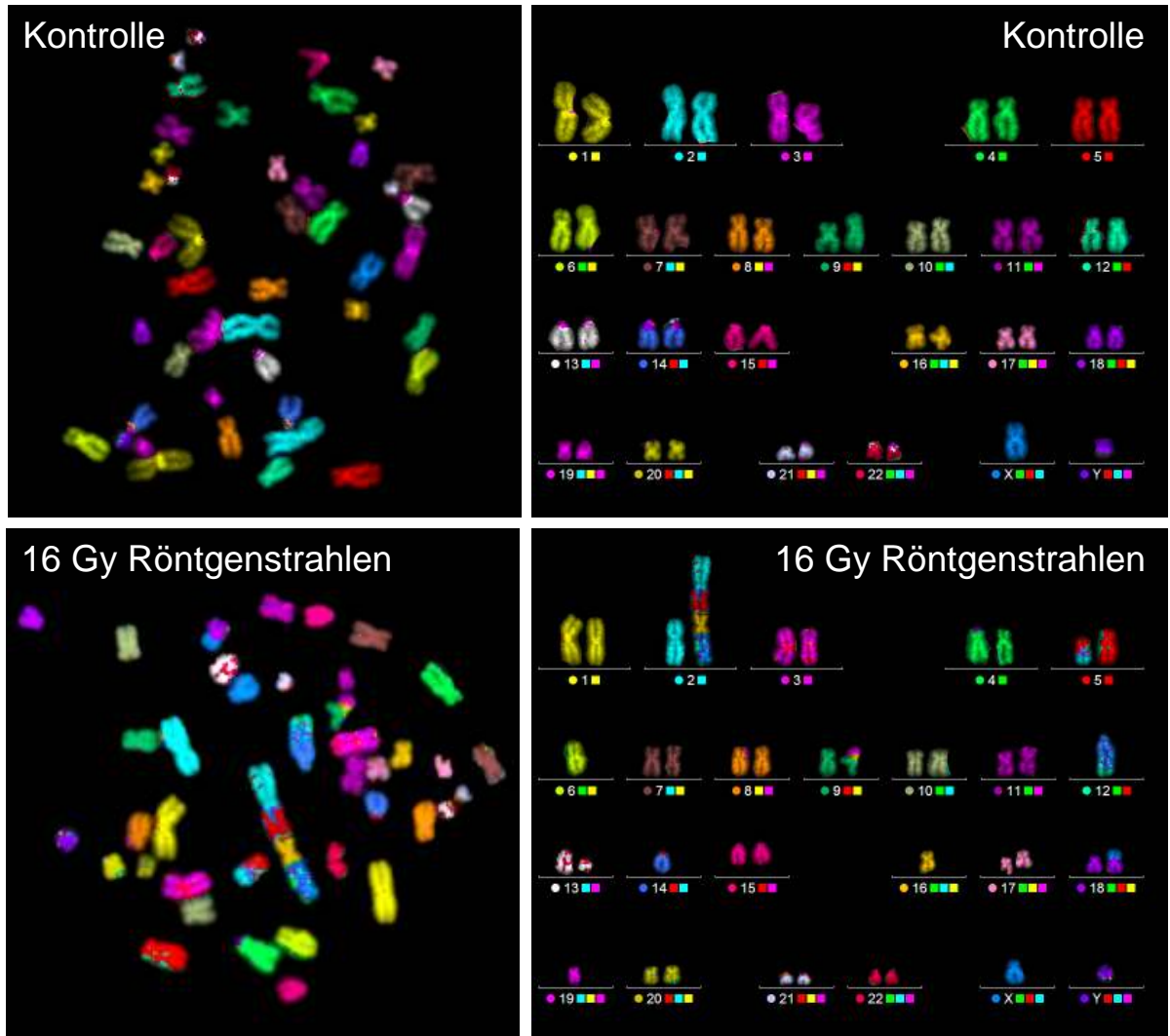


Abbildung 5.12: Multiplex-FISH Analyse einer Metaphase der Kontrollpopulation und der Nachkommen der mit 16 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen, 244 Tage nach der Bestrahlung. Links ist die Falsch-Farben-Analyse der Metaphase nach ihrer Hybridisierung abgebildet, rechts das daraus erstellte Karyogramm der jeweiligen Metaphase. In der Kontrollzelle sind alle 46 Chromosomen vorhanden und intakt. Der Nachkomme der mit ursprünglich 16 Gy bestrahlten Zelle zeigt dagegen eine Vielzahl von Aberrationen: Unter anderen ist ein Chromosom 6 und 12 verloren gegangen und Teile der Chromosomen 2, 5, 14 und 16 bilden ein multizentrisches Chromosom. (Präparation, Fotografie und Analyse: Sommer 2006)

für die geringe Expression von p21 und die damit einher gehende hohe Proliferationsrate dieses dominanten Klons. Die deutliche Zunahme der Proliferation und das Auftreten des morphologisch unterschiedlichen Zelltyps (Abbildung 4.23) fiel in den Zeitraum zwischen 70 und 130 Tage nach der Bestrahlung und deutet darauf hin, dass es sich hierbei um eine neu entstandene Aberration handelt, die nicht direkt durch die Bestrahlung erzeugt wurde. Untersuchungen zu späteren Zeiten zeigten, dass die Aberration des dominanten Klons nicht stabil war. Es traten weitere starke Veränderungen des Karyotyps auf, die von einem Rückgang der Proliferation begleitet wurden (Abbildung 4.26, S. 4.26). Parallel dazu näherte sich auch die p53- und p21-Expression wieder der der anderen Populationen an (Abbildung 4.30, S. 4.30). Der zeitweilige Verlust der p53-p21-Zellzykluskontrolle führte demnach nicht zu einer Immortalisierung der Fibroblasten.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Expansion des Klons auf einer Veränderung des Status des p53- oder p21-Gens beruht, ist die Ähnlichkeit mit der Entwicklung von Fibroblasten, deren p53- bzw. p21-Funktion inaktiviert wurde. Brown u. a. (1997) beobachteten, dass humanen Fibroblasten, deren p21-Gen mutiert wurde, eine verlängerte Lebensspanne hatten, die mit einer deutlichen p16-Expression endete. Die Transfektion von normalen Fibroblasten mit dem E6-Gen des Humanen Papillomvirus 16, dessen Genprodukt die Funktion von p53 inhibiert, führte ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensspanne (Kessis u. a. 1993; Tsang u. a. 1995). Bis zum Stillstand der Proliferation nahm dabei die Expression von p16 und die genetische Instabilität zu (Bond u. a. 1999; Dulic u. a. 2000; Plug-Demaggio und McDougall 2002; Plug-DeMaggio u. a. 2004).

5.2.3.5 Zusammenfassung

Die Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten stellten ihre Teilungsaktivität nach einer Phase mit normaler Proliferation früher ein als die unbestrahlten Kontrollzellen. Beim Übergang in den Teilungsstillstand traten Veränderungen auf, die auch bei der replikativen Seneszenz unbestrahlter Fibroblasten beobachtet wurden: Die Zellen gingen zum überwiegenden Teil in das MF III Differenzierungsstadium über, ihre Morphologie ähnelte dabei der der Kontrollzellen. Die β -Galaktosidase-Aktivität nahm im ähnlichen Umfang zu. Die Expression von p21 nahm gegenüber den Kontrollzellen zu und die Menge an p53 war gegenüber dem Wert zu Beginn der Kultivierung erhöht. Im Unterschied zu seneszenten Kontrollzellen zeigte sich jedoch bei den Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten eine hohe p16-Expression. Die p16-Expression der ursprünglich mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten war dabei bis zum Teilungsstillstand größer als die der ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten.

Die ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Population wurde durch einen einzelnen Klon übernommen, der eine hohe Teilungsaktivität hatte. Das Muster der Proteinexpression und die Chromosomenanalyse des Klons deuten darauf hin, dass die hohe Teilungsaktivität durch den Verlust des p21-Gens und einer damit einher gehenden Deregulation der Zellzykluskontrolle ausgelöst wurde. Die Nachkommen des Klons zeigten zwar eine hohe genetische Instabilität, es kam jedoch nicht zu einer Immortalisierung der Zellen.

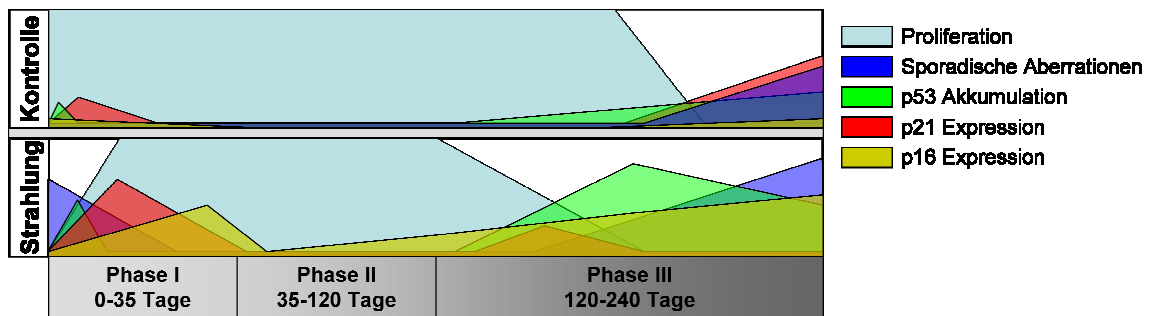


Abbildung 5.13: Schematische Darstellung der Proliferation, Chromosomenaberrationen und Proteinexpression in Kontrollzellen und bestrahlten Vorhautfibroblasten.

5.2.4 Schlussfolgerung: Vorzeitige Alterung nach Bestrahlung

Die Entwicklung der bestrahlten AG 1522 Fibroblasten und deren Nachkommen vom Zeitpunkt der Bestrahlung bis zur replikativen Seneszenz lässt sich nicht mit der einheitlichen Reaktion einer einzelnen Population erklären. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der Bestrahlung von Fibroblasten Subpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Reaktionen entstehen. Die Entwicklung einer bestrahlten Fibroblastenpopulation lässt sich in drei Phasen einteilen, die fließend ineinander übergehen. Die erste Phase umfasst die Entwicklung der nach Bestrahlung inhibierten Fibroblasten. Die zweite Phase wird durch die Entwicklung der nach Bestrahlung proliferierenden Zellen und ihrer Nachkommen charakterisiert. Die dritte Phase beschreibt die replikative Seneszenz der Nachkommen der bestrahlten Zellen (Abbildung 5.13).

In der ersten Phase findet bereits eine Aufteilung der Zellkultur in Subpopulationen statt. Ein dosisabhängiger Anteil der Zellen proliferiert nach der Bestrahlung nicht mehr und seine Entwicklung unterscheidet sich in den untersuchten Endpunkten nicht von der Entwicklung unbestrahlter Fibroblasten beim Übergang in die replikative Seneszenz. Der andere Teil der Fibroblasten proliferiert nach der Bestrahlung, die weitere Entwicklung dieser Subpopulation ist dabei von der eingesetzten Strahlenqualität abhängig:

- Bei Bestrahlung mit dicht ionisierenden Kohlenstoff-Ionen werden Zellen unterschiedlich oft getroffen, was auf Grund der inhomogenen Dosisverteilung zu individuell unterschiedlich stark geschädigten Zellen führt. Die wenig geschädigten Zellen proliferieren und haben einen Wachstumsvorteil gegenüber den stark geschädigten Zellen, bei wiederholter Subkultivierung werden letztere deshalb ausgedünnt.
- Bei Bestrahlung mit locker ionisierenden Röntgenstrahlen wird die Dosis homogen verteilt, was zu einer gleichmäßigen Verteilung der Schäden führt. Die nach Bestrahlung zur Proliferation fähigen Zellen proliferieren langsamer und reagieren wahrscheinlich empfindlicher auf den beim Subkultivieren auftretenden Stress als die Zellen, die nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen zur Proliferation fähig sind.

Einen zusätzlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Population nach der Bestrahlung hat sicherlich auch die natürliche Inhomogenität der Fibroblastenpopulation, die u. a. dazu führt, dass einzelne Zellen einer Population unterschiedliche Lebensspannen haben (Smith und Hayflick 1974). Da eine niedrige Lebensspanne auf ein höheres individuelles Zellalter hindeutet, ist vorstellbar, dass derartige Zellen auf Strahlung bevorzugt mit einem Stillstand der Proliferation reagieren und der Wachstumsvorteil der langlebigen Zellen zusätzlich erhöht wird.

Die Bestrahlung und die danach folgenden Subkultivierungen üben einen Selektionsdruck auf die Fibroblastenpopulation aus, der die Einheitlichkeit der Population erhöht. Die Folge ist, dass mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung die Zellen mit der höchsten Teilungsgeschwindigkeit den größten Anteil der Population darstellten. Bei den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen tritt diese Vereinheitlichung auf Grund der inhomogenen Verteilung der Schäden schnell ein, bei den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen erfolgt sie über einen längeren Zeitraum. Dieser zeitliche Verlauf lässt sich aus der Entwicklung der Fibroblasten ableiten: In den mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen stellen sich relativ schnell wieder Verhältnisse ein, die der Kontrollpopulation ähneln. Demgegenüber läuft dieser Prozess in den mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen langsamer ab. Die niedrigere Proliferation und die zeitlich verzögerte und deutliche Expression von p16 deuten darauf hin, dass hier auch noch zu späteren Zeiten eine Selektion geschädigter Zellen stattfindet.

Die zweite Phase reflektiert die aus der Selektion resultierende Vereinheitlichung der bestrahlten Populationen. In dieser Phase lassen sich die ursprünglich bestrahlten Populationen nicht mehr durch Proliferation, Morphologie, Differenzierungsgrad, Proteinexpression und -aktivität unterscheiden. Auch die ursprünglich applizierten Dosen und Strahlenqualitäten sind anhand der untersuchten Endpunkte nicht differenzierbar. Dass es bei den Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten trotzdem Unterschiede zur unbestrahlten Population gibt, zeigt sich erst bei deren Übergang in die replikative Seneszenz.

In der dritten Phase kommt es zum Übergang der Nachkommen in die replikative Seneszenz. Die replikative Seneszenz tritt bei den Nachkommen der bestrahlten Fibroblasten früher auf als bei der Kontrollpopulation. Die untersuchten Endpunkte deuten darauf hin, dass der Übergang in die replikative Seneszenz in beiden Fällen zum Teil auf gemeinsamen Mechanismen basiert. In beiden Fällen nahm die p53-Proteinmenge und die p21-Expression gegenüber früheren Zeitpunkten zu und die meisten Zellen befanden sich im Differenzierungsstadium MF III. Allerdings enthielten zumindest die Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Populationen auch einen gegenüber der Kontrollpopulation erhöhten Anteil apoptotischer und postmitotischer Zellen. Desweiteren war die p16-Expression der Gesamtpopulation erhöht, was bei der Kontrollpopulation zu keiner Zeit beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Nachkommen der bestrahlten Zellen am Ende ihrer Lebensspanne verschiedene Subpopulationen enthalten, deren Übergang in die replikative Seneszenz durch unterschiedliche Signalwege ausgelöst wird: Bei einem Teil der Zellen erfolgt die replikative Seneszenz über die Aktivierung des p53-p21-Signalwegs, entsprechend den unbestrahlten Kontrollzellen. Bei

einer weiteren Subpopulation wird die replikative Seneszenz über die Induktion von p16 ausgelöst. Eine dritte Subpopulation erreicht nicht die replikative Seneszenz und beendet ihre Teilungsaktivität durch Apoptose. Für eine derartige Zusammensetzung aus unterschiedlichen Subpopulationen spricht auch, dass die Induktion von p21 und p16 in humanen Fibroblasten unabhängig voneinander und nur bei einem geringen Anteil der Zellen gleichzeitig auftritt (Herbig u. a. 2004).

Die Entstehung und Gewichtung der verschiedenen Subpopulationen lässt sich mit den bei der Bestrahlung verwendeten Strahlenqualitäten erklären: Die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen führte dazu, dass in der ersten Phase eine kleine Subpopulation gering geschädigter Zellen selektiert wurde. Bei dieser Zellpopulation kam es während der weiteren Kultivierung nur zu einer geringen Aufspaltung in Subpopulationen und einer relativ gleichartigen Ausprägung der replikativen Seneszenz. Die nach der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen proliferierende Subpopulation waren dagegen global stärker geschädigt, die zur Wiederaufnahme der Proliferation notwendige Behandlung der Schäden führte möglicherweise sogar zu einer dauerhaft reduzierten Integrität von kritischen Strukturen der DNA. Entsprechend der Situation in der ersten Phase führte diese globale Schädigung dazu, dass der Übergang in die zelluläre Seneszenz auch durch Induktion von p16 statt durch Aktivierung von p53 und p21 ausgelöst wurde.

Die genetische Stabilität der Nachkommen der bestrahlten Zellen unterschied sich bei den ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Populationen im Wesentlichen nicht von der der Kontrollpopulation. Der Anteil aberranter Zellen blieb bei ihnen bis zum Übergang in die replikative Seneszenz niedrig. Die wenigen Zellen, die in der seneszenten Population noch teilungsaktiv waren, hatten zwar eine erhöhte Anzahl an Aberrationen, sie stellten aber nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtpopulation dar und erlangten durch ihre Aberrationen keinen Wachstumsvorteil. Im Unterschied dazu demonstriert die bei den Nachkommen der mit 8 Gy und 16 Gy Röntgenstrahlen beobachtete Entwicklung, dass höhere Dosen locker ionisierender Strahlen die Entstehung von Klonen mit Wachstumsvorteilen begünstigen, da bei beiden Populationen der Anteil aberranter Zellen zunahm und auf genetische Instabilität hindeutete. In der ursprünglich mit 16 Gy bestrahlten Population entstand mehrere Monate nach der Bestrahlung sogar ein Klon, dessen Inaktivierung der p21-Expression und zeitweiliger Verlust der Zellzykluskontrolle wahrscheinlich durch die Neuentstehung chromosomaler Aberrationen ausgelöst wurde. Diese Eigenschaft der locker ionisierenden Strahlen wird auch durch neuere Experimente bestätigt, bei denen Fibroblastenpopulationen, die mit hohen Dosen von Röntgenstrahlen in einzelnen oder mehreren Fraktionen bestrahlt wurden, auch noch zu späten Zeiten nach der Bestrahlung eine erhöhte Anzahl an Aberrationen enthielten (Zahnreich 2006). Der Verlust der p21-Expression reichte bei den AG 1522 Fibroblasten nicht aus, um eine Immortalisierung des Klons zu bewirken, möglicherweise war der Grund dafür die genetische Instabilität des Klons. Die Zunahme der Instabilität wurde von einer sehr deutlichen Zunahme der p16-Expression und Abnahme der Proliferation begleitet, die zeigt, dass der p16-Signalweg eine zusätzliche Kontrollinstanz zur Begrenzung der Proliferation darstellt.

Bedeutung für die Tumorentstehung

Die Entstehung von Tumoren wird nach dem momentanen Wissensstand durch die Umgehung mehrerer Mechanismen ausgelöst, die begrenzend auf die Proliferation wirken (Übersicht in: Alberts u. a. 1994). In *in-vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass die Deaktivierung wichtiger Komponenten der Zellzykluskontrolle (z. B. Rb, p53, p21 und p16) zunächst nur zu einem verstärkten Wachstum der Zellen führt, das auf Grund der Verkürzung der Telomere in einem Zustand der Krise endet (Übersicht in: Shay und Wright 2005). Zur Immortalisierung derart geschädigter Zellen ist zusätzlich eine Erhöhung der Telomeraseaktivität notwendig (Übersicht in: Shin u. a. 2006). Eine weitere Voraussetzung für das ungebremste Wachstum eines Tumors ist u. a. auch der Verlust der Kontakthemmung (Übersicht in: Mareel und Leroy 2003).

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der proliferierenden Subpopulation der bestrahlten Zellen und ihren Nachkommen. Die Langzeitentwicklung der nach Bestrahlung inhibierten Subpopulation konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht analysiert werden, da die schnell proliferierenden Zellen durch die Subkultivierungen bevorzugt wurden. Hinsichtlich der Tumorentstehung gelten jedoch für beide Subpopulationen ähnliche Bedingungen, da die Inhibition ihrer Zellzyklusprogression letztlich durch die Induktion von p21 oder p16 verursacht wird. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verlust der p21-Expression stellt daher möglicherweise einen ersten Schritt auf dem Weg zur Tumorentstehung dar. Die resultierende höhere Teilungsaktivität und die nach locker ionisierender Bestrahlung beobachtete erhöhte genetische Instabilität führten jedoch nicht zur Entstehung weiterer maligner Veränderungen des Genoms, die Proliferation der Zellen endete stattdessen mit der Expression von p16. Ob weitere Schritte zur Tumorentstehung bei AG1522 Fibroblasten vorkommen können und ob locker ionisierende Strahlen dabei einen größeren Einfluss haben als dicht ionisierende Strahlen, muss daher in weiteren Experimenten untersucht werden.

Bedeutung für andere Spätkomplikationen

Bei der Strahlentherapie mit Kohlenstoff-Ionen werden im Unterschied zur den Experimenten der vorliegenden Arbeit nur hochenergetische Teilchen eingestrahlt, die beim Durchdringen des gesunden Gewebes einen niedrigen LET haben und wenig Dosis im großen Radius um die Teilchenspur deponieren (siehe Kapitel 2, Abbildung 2.2, S. 9, Übersicht in: Weyrather und Debus 2003). Erst beim Erreichen des Tumors ist die Energie der Ionen so niedrig geworden, dass es zur einer hohen Dosisdeposition im geringen Abstand zur Teilchenspur kommt und ihr LET dem der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ionen entspricht. Da bei der Tumorthherapie außerdem viel höhere Fluenzen als in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden, kommt es so zu einer relativ homogenen Verteilung der Dosis im gesunden Gewebe vor dem Tumor. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich unter Berücksichtigung dieser Rahmenbedingungen auf die Therapiesituation übertragen.

Die Dosisdeposition entlang der Teilchenspur führt bei mit Ionen bestrahlten Zellen dazu, dass es zu einer niedrigeren globalen Schädigung der DNA kommt als bei Bestrahlung mit Photonen. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich die Ursache dafür, dass die Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten schneller proliferieren und dabei eine niedrigere p16-Expression und eine höhere genetische Stabilität zeigen als die Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen (Abschnitt 4.2.1, S. 55 und 4.2.2, S. 72). Dies führt dazu, dass die mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten proliferierenden Fibroblasten stärkere Ähnlichkeit mit den unbestrahlten Fibroblasten haben, als die mit Röntgenstrahlen bestrahlten Fibroblasten. Die Entstehung von Spätkomplikationen, die auf einer krankhaften Veränderung des bestrahlten Gewebes beruhen (z. B. Fibrose), wird demnach durch dicht ionisierenden Strahlen nicht stärker begünstigt als durch locker ionisierenden Strahlen. In der Therapiesituation nähert sich die Wirkung der Ionen im Eingangsbereich durch ihre hohe Fluenz und ihren niedrigen LET der Wirkung den Photonen (Abschnitt 2.1.4, S. 9). In diesem Bereich ist für Ionen daher eine geringere Schädigung zu erwarten, weil das invertierte Dosisprofil von Kohlenstoff-Ionen im gesunden Gewebe eine niedrigere Dosis erlaubt als bei Bestrahlung mit Photonen.

5.2.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden bestrahlte Fibroblasten erstmals bis zu ihrer replikativen Seneszenz kultiviert und analysiert. Die Langzeitkultivierung über einen derartig langen Zeitraum hat sich als geeignetes System erwiesen, um die strahleninduzierten Veränderungen bei den bestrahlten Zellen und ihren Nachkommen zu untersuchen. Die Strahlung führt dazu, dass die bestrahlte Population in Subpopulationen aufgetrennt wird. Ein Teil der Fibroblasten proliferiert nicht mehr und altert vorzeitig, während sich ein anderer Teil nach der Bestrahlung weiterhin teilt. Die wiederholte Subkultivierung ermöglicht dabei die Analyse derjenigen Fibroblasten, die das größte Teilungspotential haben und die eine Rolle bei der Entstehung von Spätkomplikationen spielen könnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten weniger geschädigt sind als die Nachkommen der mit Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen. Dies lässt für Kohlenstoff-Ionen ein geringeres Risiko von Spätkomplikationen erwarten als für Photonenstrahlen. Diese Hypothese wird derzeit in weiteren Folgeexperimenten untersucht, die sich z. T. auf die Rolle einzelner Zellen konzentrieren. Ein Schwerpunkt ist dabei die Langzeitentwicklung der individuellen Zellen, die nach der Bestrahlung zur Bildung von Klonen in der Lage sind. Dabei sollen Unterschiede hinsichtlich des genetischen Status und der weiteren Entwicklung der Klone bei verschiedenen Strahlenqualitäten erforscht werden.

A Anhang

A.1 Zellkulturmedien und Zusatzstoffe

Zellkulturmedien

Tabelle A.1: Kulturmedium für AG 1522 Fibroblasten

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
EMEM Basis Medium mit EBSS	89,3	% v/v	500	ml	
FCS	8,9	% v/v	50	ml	
L-Glutamin	1,8	% v/v	5	ml	
Neomycin/Bacitracin oder Penicillin/Streptomycin	1,8	% v/v	5	ml	

Tabelle A.2: Tiefkühlmedium für AG-Zellen

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
EMEM Basis Medium mit EBSS	90	% v/v	18	ml	
Glyzerin	10	% v/v	2	ml	

Seren, Antibiotika, Peptide und Trypsin

Tabelle A.3: Verwendete Seren, Antibiotika, Peptide und Trypsin

Zusatzstoff	Produkt	Kat.-Nr.	Bezugsquelle
Serum	Fötales Kälberserum (FCS)	S0115	Biochrom AG, Berlin
Antibiotika	Neomycin/Bacitracin 1 mg/50 U/ml	A2412	Biochrom AG, Berlin
	Penicillin/Streptomycin 10 000 U/10 000 µg/ml	A2213	Biochrom AG, Berlin
Peptide	N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	L0202	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	Trypsin (0,5g/l) + EDTA (1g/l) w/o Ca, Mg	PIO-027500	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Chargen-Nummern der Medien und Zusatzstoffe

Tabelle A.4: Chargen-Nummern der bei den Experimenten verwendeten Medien und Mediumzusätze

Experiment	EMEM+EBSS	FCS	Peptide	Neo/Bac	Pen/Strep	Trypsin
11/03	2SP0006	165 A	980 E	586 A	1063 E	260702
4/04	2SP0006	165 A	922 FF	882 FF	1063 E	260702
8/04	2SP0006	165 A	922 FF	882 FF	858 FF	260702
2/05	2SP0006	370 FF	0353 G	882 FF	858 FF	310104
6/05	2SP0006	370 FF	1097 G	882 FF	858 FF	152302
7/05	2SP0006	370 FF	1097 G	882 FF	858 FF	580305
2/06	2SP0006	370 FF	0658 H	882 FF	0859 H	580305

A.2 Chemikalien und Kits

Chemikalien

Tabelle A.5: Verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Bezeichnung	molare Masse ($\frac{\text{g}}{\text{mol}}$)	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % 37,5:1 (gebrauchsfertig)		Sigma-Aldrich, München
AEBSF (4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfofluorid)	239,5	Sigma-Aldrich, München
Aprotinin	6511,57	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	228,2	Sigma-Aldrich, München
BRADFORD-Lösung (Coomassie Brilliant Blau G250)		Roth, Karlsruhe
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)	307,1	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	669,96	Sigma-Aldrich, München
BSA (Rinderserumalbumin)		Sigma-Aldrich, München
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid)	350,25	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylformamid (N,N-)	73,1	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat Dodekahydrat	358,14	Merck, Darmstadt
ECL+		GE Healthcare, München
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure)	292,25	Sigma-Aldrich, München
Ethanol p. a.	46,07	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	394,32	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd 37 % w/v in Wasser	30,03	Merck, Darmstadt
GIEMSA-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung)		Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	100,12	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	92,09	Sigma-Aldrich, München
Glycin	75,07	Sigma-Aldrich, München
Hoechst-33258 (Bisbenzimidazol trihydrochlorid)	533,88	Sigma-Aldrich, München
Igepal CA-630	294,43	Sigma-Aldrich, München
Isoton (Casyton)		Schärfe System, Reutlingen

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A.5

Bezeichnung	molare Masse ($\frac{\text{g}}{\text{mol}}$)	Bezugsquelle
Kaliumdihydrogenphosphat	136,09	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (III)	329,26	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (II)	422,41	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid/Hexahydrat	203,3	Merck, Darmstadt
MAY-GRÜN WALT-Lösung (Eosin-Methylenblaulösung)		Merck, Darmstadt
Mecaptoethanol, (2-)	78,13	Sigma-Aldrich, München
Methanol p. a.	632,04	Merck, Darmstadt
Methylenblau	319,86	Merck, Darmstadt
Natriumazid	65,01	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	58,44	Applichem, Darmstadt
Natriumcitrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	294,1	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	414,57	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid	41,99	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid	40	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	183,9	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	30,01	Sigma-Aldrich, München
PBS (DPBS), Pulver ohne Calcium und Magnesium		Biochrom, Berlin
Phosphorsäure		Merck, Darmstadt
Ribonuklease A (90 U/mg)		Roth, Karlsruhe
Salzsäure	36,46	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	288,38	Sigma-Aldrich, München
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	116,21	Merck, Darmstadt
TRIS base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	121,14	Applichem, Darmstadt
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	646,85	Applichem, Darmstadt
Tween 20 (Polyethylenglykolsorbitanmonolaurat)	1227,72	Sigma-Aldrich, München

Kits

Tabelle A.7: Verwendete Kits und ihre Bezugsquellen

Kit	Produkt	Bezugsquelle
Detektion des BrdU-Einbaus	BrdU labelling & detection Kit I	Roche Diagnostics, Mannheim
Test auf Mykoplasmen	PCR Mycoplasma Test Kit A3744	Applichem, Darmstadt

A.3 Lösungen und Puffer

Western-Blotting und SDS-PAGE

Tabelle A.8: Lysepuffer für den Zellaufschluss

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Igepal CA-630	34	$\mu\text{mol/l}$	1000	μl	2 % w/v
TRIS pH 7,6	50	mmol/l			+ 100 mmol/l , pH 7,6
Natriumchlorid	150	mmol/l			+ 300 mmol/l
EDTA	1	mmol/l			+ 2 mmol/l
Natriumdesoxycholat	12,1	$\mu\text{mol/l}$	500	μl	50 mmol/l
SDS	3,5	$\mu\text{mol/l}$	20	μl	350 mmol/l
AEBSF	1	mmol/l	10	μl	200 mmol/l
Natriumfluorid	50	mmol/l	200	μl	500 mmol/l
Natriumorthovanadat	1	mol/l	10	μl	200 mmol/l
Aprotinin	153,6	nmol/l	20	μl	0,1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$
Wasser			240	μl	

Tabelle A.9: SDS-Polyacrylamid-Trenngel, 12 %

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Acrylamid/Bisacrylamid	0,4	% v/v	8	ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Trenngel-Puffer	0,35	% v/v	7	ml	4 x Trenngel-Puffer
Wasser	0,25	% v/v	5	ml	
APS	0,0005	% v/v	0,1	ml	10 % w/v
TEMED	0,0005	% v/v	0,01	ml	

Tabelle A.10: SDS-Polyacrylamid-Trenngel, 15 %

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Acrylamid/Bisacrylamid	0,5	% v/v	10	ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Trenngel-Puffer	0,25	% v/v	5	ml	4 x Trenngel-Puffer
Wasser	0,25	% v/v	5	ml	
APS	0,0005	% v/v	0,1	ml	10 % w/v
TEMED	0,0005	% v/v	0,01	ml	

Tabelle A.11: SDS-Polyacrylamid-Sammelgel, 3,2 %

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Acrylamid/Bisacrylamid	0,11	% v/v	1	ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Sammelgel-Puffer	0,26	% v/v	2,4	ml	4 x Sammelgel-Puffer
Wasser	0,63	% v/v	5,9	ml	
APS	0,0005	% v/v	0,1	ml	10 % w/v
TEMED	0,0005	% v/v	0,01	ml	

Tabelle A.12: 4 x Trenngel-Puffer

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TRIS base	150,00	mmol/l	18,2	g	
Wasser			70	ml	
Salzsäure			ad pH 8,8		37 % Salzsäure
SDS	35,00	mmol/l	4	ml	10 % w/v
Wasser			ad 100	ml	

Tabelle A.13: 4 x Sammelgel-Puffer

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TRIS base	50,00	mmol/l	6,1	g	
Wasser			70	ml	
Salzsäure			ad pH 6,7		37 % Salzsäure
SDS	35,00	mmol/l	4	ml	10 % w/v
Wasser			ad 100	ml	

Tabelle A.14: SDS-Laufpuffer für die Gelelektrophorese

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TRIS base	25	mmol/l	3,06	g	
Glycin	190	mmol/l	14,26	g	
SDS	3,5	mmol/l	1	g	
Wasser			ad 1000	ml	

Tabelle A.15: SDS-Probepuffer für den Probeauftrag

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
SDS	145,5	mmol/l	6	ml	10% w/v
TRIS pH6,7	69,9	mmol/l	1	ml	1 mmol/l, pH 6,7
Glycerin	6,7	mol/l	7	ml	
Bromphenolblau	6,3	mmol/l	0,3	ml	0,2 mg/ml

Tabelle A.16: Transferpuffer für den *Western-Blot*

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Glycin	150	mmol/l	16,9	g	
TRIS	13,3	mmol/l	20	ml	1 mmol/l, pH 8,3
SDS	3,5	mmol/l	15	ml	10 % w/v
Wasser			1165	ml	
Methanol			300	ml	

Tabelle A.17: TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20)-Lösung

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TRIS	10	mmol/l	100	ml	1 mol/l, pH 8,0
Natriumchlorid	150	mmol/l	500	ml	3 mol/l
Tween 20	450	μmol/l	5	ml	
Wasser			ad 1000	ml	

Tabelle A.18: Blocking-Lösung für die Detektion der *Western-Blots*

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TBST	95	% w/w	100	ml	
Milchpulver ($\leq 1\%$ w/w Fett)	5	% w/w	5	g	

Tabelle A.19: Ablösepuffer für die Neudetektion der *Western-Blots* (Stripping-Buffer)

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
TRIS	200	mmol/l	20	ml	1 mol/l, pH 6,7
SDS	20	mmol/l	6	ml	10 % w/v
2-Mercaptoethanol	100	mmol/l	714	μl	
Wasser			74	ml	

Detektion der BrdU-Inkorporation

Tabelle A.20: Lösung zum Fixieren der Zellen

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Ethanol	70	% v/v	70	ml	
Glycin	15	mmol/l	30	ml	50 mmol/l, pH 2,0

Hoechst-Färbelösung

Tabelle A.21: Hoechst-33258-Lösung zur DNA-Färbung

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
PBS ^{w/o}	80	% v/v	400	ml	
Ethanol	20	% v/v	100	ml	
Hoechst-33258	3	μmol/l	8	ml	1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$

Morphologische Färbung

Tabelle A.22: Soerensen-Puffer für die GIEMSA-Färbung

Bestandteil	Konzentration	Einheit	Ansatz	Einheit	Stammlösung
Dinatriumhydrogenphosphat	67	mmol/l	24	g	
Kaliumdihydrogenphosphat	67	mmol/l	9,1	g	
Wasser			ad 1000	ml	

β-Galactosidase-Färbung

A.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Tabelle A.23: Verwendete Primär-Antikörper

Antigen	Typ	Spezies	Klon	Katalog-Nr.	Bezugsquelle	Konz.	Eingesetzte Verdünnung
CDK4	p	K		SC-601	Santa Cruz		1:250 (WB)
CDK4	m	M	DCS-35	SC-23896	Santa Cruz	200 µg/ml	1:250 (WB)
Cyclin D1	m	M	DCS-6	SC-20044	Santa Cruz	200 µg/ml	1:250 (WB)
p16INK4a	m	M	DCS-50.1 A7	MS-218-P1	Labvision	200 µg/ml	1:250 (WB), 1:40 (IC)
p21Cip1	m	M	70	610233	BD Biosciences	250 µg/ml	1:4000 (WB), 1:50 (IC)
p53	m	M	DO-1	OP43	Merck	100 µg/ml	1:2000 (WB), 1:50 (IC)
p53 acetylated K382	p	K		2371-PC-050	R&D Systems		1:2000 (WB), 1:50 (IC)
p53-phospho-Ser-15	m	M	16G8	9286	Cell Signaling Technology		1:2000 (WB), 1:50 (IC)
p53-phospho-Ser-15	p	K		PC386	Merck		1:2000 (WB), 1:50 (IC)
Retinoblastom (Rb)	m	M	1F8	MS-107-P1	Labvision	200 µg/ml	1:250 (WB)
Tubulin	m	M	B-5-1-2	T5168	Sigma-Aldrich		1:6000 (WB)

Typ: m (monoklonal), p (polyklonal)

Spezies: M (Maus), K (Kaninchen)

Verdünnung für: WB (*Western-Blot*) IC (Immunocytochemie)

Sekundäre Antikörper

Tabelle A.24: Verwendete Sekundär-Antikörper

Antigen	Typ	Spezies	Katalog-Nr.	Bezugsquelle	Konz.	Eingesetzte Verdünnung
Maus IgG	Meerrettichperoxidase	Schaf	NXA 931	Amersham		1:10 000 (WB)
Kaninchen IgG	Meerrettichperoxidase	Esel	NA 934	Amersham		1:10 000 (WB)
Maus IgG	Alexa-Fluor-488	Ziege	A11017	Invitrogen	2 mg/ml	1:400 (IC)
Kaninchen IgG	Alexa-Fluor-568	Ziege	A11011	Invitrogen	2 mg/ml	1:400 (IC)

Verdünnung für: WB (*Western-Blot*), IC (Immuncytochemie)

A.5 Sonstige Materialien

Einweg- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.25: Verwendete Einwegmaterialien und ihre Bezugsquellen

Material	Produkte	Bezugsquelle
Blotmembranen	Immobilon-P, PVDF	Millipore, Schwalbach
Deckgläser	ø 30 mm, 20 x 20 mm ²	IDL, Nidderau
Filme	Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Kammerobjekträger	LabTek Chamger Slide, Glas, 2 Kammern	Nunc GmbH, Wiesbaden
Pipetten	Einwegpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml)	Greiner, Frickenhausen
	Einwegpipetten (10 ml, 25 ml)	Corning Costar, Wiesbaden
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Sonstige Gefäße	Kryogefäße (1,8 ml)	Omega Scientific, CA, USA
	Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
	Mikrotiterplatten, 96-well	Nunc GmbH, Wiesbaden
Sterilfilter	ø 25 mm, 0,2 µm Porengröße, Spritzenaufsatz	Schleicher+Schuell, Einbeck
Whatman-Papier		Biometra, Göttingen
Zellkulturflaschen	12,5 cm ² , 25 cm ² , 75 cm ² , 225 cm ²	BD Biosciences, NJ, USA
Zellkulturshalen	ø 35 mm, ø 60 mm	Omega Scientific, CA, USA
Zellzählgefäße	CASYcups	Schärfe System, Reutlingen

Geräte, Apparaturen und Software

Tabelle A.26: Verwendete Geräte, Apparaturen und Software und ihre Bezugsquellen

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoklaven	Varioklav-Dampfsterilisator Vertikalautoklav 5075ELV	H+P Labortechnik, München Tuttnauer, Hauppauge, NY, USA
Blockthermostat	HB-Z	Wealtec Corp., Sparks, NV, USA
Durchflusszytometer	PAS III	Partec, Münster
Filmdigitalisierer	LS75	Kodak, Leverkusen
Filmentwickler	Curix 60	Agfa-Gevaert, Köln
Filmkassetten	X-Ray IEC 60406	REGO X-Ray, Augsburg
Flockeneisbereiter	NordCap SPR 80	Stettner Kühlanlagen, Mainz
Folienschweißgerät	Futura Jr.	Audion Electro, Weesp, NL
Gelelektrophorese	Mini-Protean Cell Set	Bio-rad, München
Hybridisator	UniTherm 6/12	Kisker, Steinfurt
Inkubatoren	CO ₂ Inkubator BBD 6220 CO ₂ Inkubator NU-4850E	Thermo Electron, Langenselbold Nuaire, Plymouth, MN, USA
Kamera	Nikon Coolpix 990	Nikon Instruments, Melville, USA
Mikroskope	Leica DMIL Leica DMRB Leitz Aristoplan Olympus BX61 + Metasystems CCD Kamera Leica DMIRE2 + SensiCam 12bit Leica DMIRBE + SensiCam 12bit	Leica, Bensheim Leica, Bensheim Leica, Bensheim Olympus, Hamburg Leica, Bensheim Leica, Bensheim
Netzteil für Elektrophorese	Consort E844	Braun, Melsungen
pH-Meter	Calimatic 766	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf Research, Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Röntgenröhre	IV-320-12	Seifert, Bridge Port, USA
Schüttler	Kleinschüttler IKA MS2 S5 Kleinschüttler KM-2	IKA, Staufen Edmund Bühler, Tübingen
Sensitometer	Sensi C21	Pehhamed, Sulzbach
Stereolupe		Zeiss, Jena
Sterilisator	SUT 6200	Thermo Electron, Langenselbold
Stickstoffbehälter	GT 80 Barnstead/Thermolyne 8plus	Air Liquide, Düsseldorf Fisher Scientific, Schwerte
Tiefkühlschrank -80 °C	Heraeus Herafreeze	Thermo Electron, Langenselbold
Trockenschrank	T 6200	Thermo Electron, Langenselbold
UV-Lampen	L1 VL-115L	Novodirekt, Karlsruhe Illkirch, Frankreich
Waagen	Präzisionswaage Sartorius handy Tischwaage 440-45	Sartorius, Göttingen Kern, Balingen-Frommern
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Plus	Millipore, Eschborn
Wasserbäder	Schüttelwasserbad Julabo SW20 Tischwasserbad Isotemp 220 + 215	Julabo, Seelbach Fisher Scientific, Schwerte
Werkbänke	Filtair 804N	Captair, Köln

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A Anhang

Fortsetzung von Tabelle A.26

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Western-Blotting</i> Zellzählung Zentrifugen	Herasafe HSP 12	Thermo Electron, Langenselbold
	LaminAir HLB 2448	Holten, Allerød, DK
	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
	Casy 1 Modell TT	Schärfe, Reutlingen
	Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Electron, Langenselbold
	Tischzentrifuge SD	Fisher Scientific, Schwerte
	Heraeus Biofuge fresco	Thermo Electron, Langenselbold
	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Electron, Langenselbold
Software		
Bildanalyse	ImageJ 1.38	National Institutes of Health, Bethesda, MY, USA
Proteinquantifizierung	Genetools 3.07g	Syngene Europe, Cambridge, UK
Zellzyklusanalyse	Multicycle	Phoenix Flow Systems, San Diego, USA
Zellkernflächenbestimmung	ImageJ 1.38	National Institutes of Health, Bethesda, MY, USA
Bildaufnahmesystem	„Zellkern-Größen bestimmen“ / LabView 6.1	Gunnar Böhrnsen, GSI, Darmstadt
	„Confocal Simulation 4.0“ / LabView 6.1	Gunnar Böhrnsen, GSI, Darmstadt

Literaturverzeichnis

- Adamson u. a. 2002** ADAMSON, AW. ; KIM, WJ. ; SHANGARY, S. ; BASKARAN, R. ; BROWN, KD.: ATM is activated in response to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA alkylation. In: *The journal of biological chemistry* 277 (2002), Oct 11, Nr. 41, S. 38222–9
- Alberts u. a. 1994** ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D.: *Molecular biology of the cell*. 3rd. Garland Publishing, Inc., New York, USA, 1994
- Alcorta u. a. 1996** ALCORTA, DA. ; XIONG, Y. ; PHELPS, D. ; HANNON, G. ; BEACH, D. ; BARRETT, JC.: Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 93 (1996), Nov 26, Nr. 24, S. 13742–7
- Alt u. a. 2002** ALT, JR. ; GLADDEN, AB. ; DIEHL, JA.: p21(Cip1) promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. In: *The journal of biological chemistry* 277 (2002), Mar 8, Nr. 10, S. 8517–23
- Amaldi und Kraft 2005** AMALDI, U ; KRAFT, G: Recent applications of synchrotrons in cancer therapy with carbon ions. In: *Europhysics news* 36 (2005), Nr. 4, S. 114–118
- Appella und Anderson 2001** APPELLA, E. ; ANDERSON, CW.: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 268 (2001), May, Nr. 10, S. 2764–72
- Ashcroft u. a. 2002** ASHCROFT, GS. ; MILLS, SJ. ; ASHWORTH, JJ.: Ageing and wound healing. In: *Biogerontology* 3 (2002), Nr. 6, S. 337–45
- Azzam u. a. 2000** AZZAM, EI. ; TOLEDO, SM. de ; WAKER, AJ. ; LITTLE, JB.: High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. In: *Cancer research* 60 (2000), May 15, Nr. 10, S. 2623–31
- Bayreuther u. a. 1988** BAYREUTHER, K. ; RODEMANN, HP. ; HOMMEL, R. ; DITTMANN, K. ; ALBIEZ, M. ; FRAN CZ, PI.: Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 85 (1988), Jul, Nr. 14, S. 5112–6
- Beausejour u. a. 2003** BEAUSEJOUR, CM. ; KRTOLICA, A. ; GALIMI, F. ; NARITA, M. ; LOWE, SW. ; YASWEN, P. ; CAMPISI, J.: Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. In: *The EMBO journal* 22 (2003), Aug 15, Nr. 16, S. 4212–22
- Becher u. a. 2001** BECHER, W. ; KONRADT, M. ; LENZ, G. ; LOTZ, R. ; RAGALLER, I. ; SCHAUB, H. ; SCHOLZ, M. ; VOSS, B. ; G., Kraft: A new irradiation facility for biological samples at the UNILAC / Gesellschaft für Schwerionenforschung. 2001. – Jahresbericht
- Ben-Porath und Weinberg 2004** BEN-PORATH, I. ; WEINBERG, RA.: When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. In: *The journal of clinical investigation* 113 (2004), Jan, Nr. 1, S. 8–13

- Ben-Porath und Weinberg 2005** BEN-PORATH, I. ; WEINBERG, RA.: The signals and pathways activating cellular senescence. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (2005), May, Nr. 5, S. 961–76
- Bender u. a. 1974** BENDER, MA. ; GRIGGS, HG. ; BEDFORD, JS.: Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation. In: *Mutation research* 23 (1974), May, Nr. 2, S. 197–212
- Berger 2001** BERGER, Stephanie: *Untersuchung der Wirkung von Schwerionenstrahlen auf menschliche Hautfibroblasten unter besonderer Berücksichtigung chromosomaler Veränderungen*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Dissertation, 2001
- Bethe 1930** BETHE, HA: Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. In: *Annalen der Physik* 5 (1930), S. 325–400
- Blakely 2001** BLAKELY, EA.: New measurements for hadrontherapy and space radiation: Biology. In: *Physica medica* 17 (2001), S. 50–58
- Blakely und Chang 2004** BLAKELY, EA. ; CHANG, PY.: Late effects from hadron therapy. In: *Radiotherapy and oncology* (2004), Dec, S. S134–40
- Bloch 1933** BLOCH, F: Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch die Materie. In: *Annalen der Physik* 16 (1933), S. 287
- Bond u. a. 1999** BOND, JA. ; HAUGHTON, MF. ; ROWSON, JM. ; SMITH, PJ. ; GIRE, V. ; WYNFORD-THOMAS, D. ; WYLLIE, FS.: Control of replicative life span in human cells: Barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. In: *Molecular and cellular biology* 19 (1999), Apr, Nr. 4, S. 3103–14
- Bond u. a. 2004** BOND, J. ; JONES, C. ; HAUGHTON, M. ; DEMICCO, C. ; KIPLING, D. ; WYNFORD-THOMAS, D.: Direct evidence from siRNA-directed knock down that p16(INK4a) is required for human fibroblast senescence and for limiting ras-induced epithelial cell proliferation. In: *Experimental cell research* 292 (2004), Jan 1, Nr. 1, S. 151–6
- Borgmann u. a. 2002** BORGMANN, K. ; ROPER, B. ; EL-AWADY, R. ; BRACKROCK, S. ; BIGALKE, M. ; DORK, T. ; ALBERTI, W. ; DIKOMEY, E. ; DAHM-DAPHI, J.: Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: Fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. In: *Radiotherapy and oncology* 64 (2002), Aug, Nr. 2, S. 141–52
- Bradford 1976** BRADFORD, MM.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72 (1976), May 7, S. 248–54
- Bringold und Serrano 2000** BRINGOLD, F. ; SERRANO, M.: Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. In: *Experimental gerontology* 35 (2000), May, Nr. 3, S. 317–29
- Brookes u. a. 2004** BROOKES, S. ; ROWE, J. ; GUTIERREZ DEL ARROYO, A. ; BOND, J. ; PETERS, G.: Contribution of p16(INK4a) to replicative senescence of human fibroblasts. In: *Experimental cell research* 298 (2004), Aug 15, Nr. 2, S. 549–59
- Brown u. a. 1997** BROWN, JP. ; WEI, W. ; SEDIVY, JM.: Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. In: *Science* 277 (1997), Aug 8, Nr. 5327, S. 831–4

- Bryant 2004** BRYANT, PE.: Repair and chromosomal damage. In: *Radiotherapy and oncology* 72 (2004), Sep, Nr. 3, S. 251–6
- Burger u. a. 1998** BURGER, A. ; LOFFLER, H. ; BAMBERG, M. ; RODEMANN, HP.: Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. In: *International journal of radiation biology* 73 (1998), Apr, Nr. 4, S. 401–8
- Campisi 1997** CAMPISI, J.: The biology of replicative senescence. In: *European journal of cancer* 33 (1997), Apr, Nr. 5, S. 703–9
- Campisi 2001** CAMPISI, J.: Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. In: *Trends in cell biology* 11 (2001), Nov, Nr. 11, S. S27–31
- Campisi 2005** CAMPISI, J.: Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. In: *Cell* 120 (2005), Feb 25, Nr. 4, S. 513–22
- Canman u. a. 1998** CANMAN, CE. ; LIM, DS. ; CIMPRICH, KA. ; TAYA, Y. ; TAMAI, K. ; SAKAGUCHI, K. ; APPELLA, E. ; KASTAN, MB. ; SILICIANO, JD.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. In: *Science* 281 (1998), Sep 11, Nr. 5383, S. 1677–9
- Chen u. a. 2004** CHEN, JH. ; STOEBER, K. ; KINGSBURY, S. ; OZANNE, SE. ; WILLIAMS, GH. ; HALES, CN.: Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. In: *The journal of biological chemistry* 279 (2004), Nov 19, Nr. 47, S. 49439–46
- Chu u. a. 1993** CHU, WT ; LUDEWIGT, BA ; RENNER, TR: Instrumentation for treatment of cancer using proton and light ion beams. In: *Reviews of scientific instrument* 64 (1993), S. 2055–2122
- Coates 2002** COATES, PJ.: Markers of senescence? In: *The journal of pathology* 196 (2002), Apr, Nr. 4, S. 371–3
- Coates u. a. 2004** COATES, PJ. ; LORIMORE, SA. ; WRIGHT, EG.: Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. In: *Mutation research* 568 (2004), Dec 2, Nr. 1, S. 5–20
- Coleman und Tsongalis 2006** COLEMAN, WB. ; TSONGALIS, GJ.: Molecular mechanisms of human carcinogenesis. In: *EXS* (2006), Nr. 96, S. 321–49
- Cristofalo u. a. 2004** CRISTOFALO, VJ. ; LORENZINI, A. ; ALLEN, RG. ; TORRES, C. ; TRESINI, M.: Replicative senescence: A critical review. In: *Mechanisms of ageing and development* 125 (2004), Oct-Nov, Nr. 10-11, S. 827–48
- Cucinotta u. a. 2001** CUCINOTTA, FA. ; SCHIMMERLING, W. ; WILSON, JW. ; PETERSON, LE. ; BADHWAR, GD. ; SAGANTI, PB. ; DICELLO, JF.: Space radiation cancer risks and uncertainties for Mars missions. In: *Radiation research* 156 (2001), Nov, S. 682–8
- Cucinotta und Durante 2006** CUCINOTTA, FA. ; DURANTE, M.: Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: Implications for space exploration by human beings. In: *The lancet oncology* 7 (2006), May, Nr. 5, S. 431–5
- DeSimone u. a. 2000** DESIMONE, JN. ; DOLEZALOVA, H. ; REDPATH, JL. ; STANBRIDGE, EJ.: Prolonged cell cycle arrest in irradiated human diploid skin fibroblasts: The role of nutrient deprivation. In: *Radiation research* 153 (2000), Feb, Nr. 2, S. 131–43

- Dean und Jett 1974** DEAN, PN. ; JETT, JH.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. In: *The journal of cell biology* 60 (1974), Feb, Nr. 2, S. 523–7
- Debus u.a. 2000** DEBUS, J. ; HABERER, T. ; SCHULZ-ERTNER, D. ; JÄKEL, O. ; WENZ, F. ; ENGHARDT, W. ; SCHLEGEL, W. ; KRAFT, G. ; WANNENMACHER, M.: [Carbon ion irradiation of skull base tumors at GSI. First clinical results and future perspectives]. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 176 (2000), May, Nr. 5, S. 211–6
- Desmouliere und Tuchweber 1999** DESMOULIERE, A. ; TUCHWEBER, B.: *Current topics in pathology*. Bd. 93: *Tissue repair and fibrosis*. 1st. Springer Berlin, 1999
- Dilley u.a. 2003** DILLEY, TK. ; BOWDEN, GT. ; CHEN, QM.: Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: Induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. In: *Experimental cell research* 290 (2003), Oct 15, Nr. 1, S. 38–48
- Dimitrijevic-Bussod u.a. 1999** DIMITRIJEVIC-BUSSOD, M. ; BALZARETTI-MAGGI, VS. ; GAD-BOIS, DM.: Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts. In: *Cancer research* 59 (1999), Oct 1, Nr. 19, S. 4843–7
- Dimri u.a. 1995** DIMRI, GP. ; LEE, X. ; BASILE, G. ; ACOSTA, M. ; SCOTT, G. ; ROSKELLEY, C. ; MEDRANO, EE. ; LINSKENS, M. ; RUBELJ, I. ; PEREIRA-SMITH, O. ; ET, al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 92 (1995), Sep 26, Nr. 20, S. 9363–7
- Dittmann u.a. 1995** DITTMANN, K. ; LOFFLER, H. ; BAMBERG, M. ; RODEMANN, HP.: Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. In: *Radiotherapy and oncology* 34 (1995), Feb, Nr. 2, S. 137–43
- Di Fagagna u.a. 2004** DI FAGAGNA, F. ; TEO, SH. ; JACKSON, SP.: Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. In: *Genes & development* 18 (2004), Aug 1, Nr. 15, S. 1781–99
- Di Leonardo u.a. 1994** DI LEONARDO, A. ; LINKE, SP. ; CLARKIN, K. ; WAHL, GM.: DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. In: *Genes & development* 8 (1994), Nov 1, Nr. 21, S. 2540–51
- Drayton u.a. 2003** DRAYTON, S. ; ROWE, J. ; JONES, R. ; VATCHEVA, R. ; CUTHBERT-HEAVENS, D. ; MARSHALL, J. ; FRIED, M. ; PETERS, G.: Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. In: *Cancer cell* 4 (2003), Oct, Nr. 4, S. 301–10
- Duesberg u.a. 2005** DUESBERG, P. ; LI, R. ; FABARIUS, A. ; HEHLMANN, R.: The chromosomal basis of cancer. In: *Cellular oncology* 27 (2005), Nr. 5–6, S. 293–318
- Dulic u.a. 2000** DULIC, V. ; BENEY, GE. ; FREBOURG, G. ; DRULLINGER, LF. ; STEIN, GH.: Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. In: *Molecular and cellular biology* 20 (2000), Sep, Nr. 18, S. 6741–54
- Dumaz und Meek 1999** DUMAZ, N. ; MEEK, DW.: Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. In: *The EMBO journal* 18 (1999), Dec 15, Nr. 24, S. 7002–10

- Durante 2004** DURANTE, M.: Heavy ion radiobiology for hadrontherapy and space radiation protection. In: *Radiotherapy and oncology* (2004), Dec, S. S158–60
- Eickhoff u. a. 1999** EICKHOFF, H. ; HABERER, T. ; KRAFT, G. ; KRAUSE, U. ; RICHTER, M. ; STEINER, R. ; DEBUS, J.: The GSI cancer therapy project. In: *Strahlentherapie und Onkologie* (1999), Jun, S. 21–4
- Eidelman u. a. 2005** EIDELMAN, S. ; GAISSER, TK. ; STANEV, T. ; SOLOLSKY, PV. ; STREITMATTER, RE: Review of particle physics - cosmic rays. In: *Physics letters B* 592 (2005), Nr. 1, S. 1
- El-Deiry u. a. 1993** EL-DEIRY, WS. ; TOKINO, T. ; VELCULESCU, VE. ; LEVY, DB. ; PARSONS, R. ; TRENT, JM. ; LIN, D. ; MERCER, WE. ; KINZLER, KW. ; VOGELSTEIN, B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (1993), Nov 19, Nr. 4, S. 817–25
- Enghardt u. a. 1999** ENGHARDT, W. ; DEBUS, J. ; HABERER, T. ; HASCH, BG. ; HINZ, R. ; JÄKEL, O. ; KRÄMER, M. ; LAUCKNER, K. ; PAWELKE, J.: The application of PET to quality assurance of heavy-ion tumor therapy. In: *Strahlentherapie und Onkologie* (1999), Jun, S. 33–6
- Evans 1974** EVANS, H.: *Chromosomes and cancer*. Kap. Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes., S. 30–38, John Wiley and Sons, New York, 1974
- Evans u. a. 2003** EVANS, RA. ; TIAN, YC. ; STEADMAN, R. ; PHILLIPS, AO.: TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. In: *Experimental cell research* 282 (2003), Jan 15, Nr. 2, S. 90–100
- Fei und El-Deiry 2003** FEI, P. ; EL-DEIRY, WS.: P53 and radiation responses. In: *Oncogene* 22 (2003), Sep 1, Nr. 37, S. 5774–83
- Fournier 1999** FOURNIER, C.: *Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der Fibrose nach Ionenbestrahlung*, Technische Universität Darmstadt, Dissertation, 1999
- Fournier 2006** FOURNIER, C.: *Two color FISH analysis of 16 Gy X-irradiated cells from experiment 8/04*. 2006. – Unveröffentlichte Ergebnisse
- Fournier u. a. 1998** FOURNIER, C. ; KRAFT-WEYRATHER, W. ; KRAFT, G.: Survival, differentiation and collagen secretion of human fibroblasts after irradiation with carbon ions and X-rays. In: *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications* (1998), Jul, S. 44–7
- Fournier u. a. 2001** FOURNIER, C. ; SCHOLZ, M. ; WEYRATHER, WK. ; RODEMANN, HP. ; KRAFT, G.: Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. In: *International journal of radiation biology* 77 (2001), Jun, Nr. 6, S. 713–22
- Fournier u. a. 2003** FOURNIER, C. ; BRONS, S. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Quantification of chemiluminescent signals using photon-sensitive films or a CCD camera. In: *Biotechniques* 35 (2003), Aug, Nr. 2, S. 284–90
- Fournier u. a. 2004** FOURNIER, C. ; WIESE, C. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. In: *Radiation research* 161 (2004), Jun, Nr. 6, S. 675–84
- Fournier u. a. 2007** FOURNIER, C. ; BECKER, D. ; WINTER, M. ; BARBERET, P. ; HEISS, M. ; TOPSCH, J. ; TAUCHER-SCHOLZ, G.: Cell cycle-related bystander responses are not increased with LET following heavy ion irradiation. In: *Radiation research* 167 (2007), Nr. 2, S. 194–206

- Fricke und Hart 1966** FRICKE, H ; HART, EJ: *Radiation dosimetry*. Academic Press, New York, 1966
- Fujitaka u. a. 1999** FUJITAKA, K ; MAJIMA, H ; ANDO, K ; YASUDA, H ; SUZUKI, M: *Risk evaluation of cosmic ray exposure in long-term manned space mission*. Kodansha Scientific Ltd, Tokyo, 1999
- Gadbois u. a. 1996** GADBOIS, DM. ; CRISSMAN, HA. ; NASTASI, A. ; HABBERSSETT, R. ; WANG, SK. ; CHEN, D. ; LEHNERT, BE.: Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. In: *Radiation research* 146 (1996), Oct, Nr. 4, S. 414–24
- Gadbois u. a. 1997** GADBOIS, DM. ; BRADBURY, EM. ; LEHNERT, BE.: Control of radiation-induced G1 arrest by cell-substratum interactions. In: *Cancer research* 57 (1997), Mar 15, Nr. 6, S. 1151–6
- Gartel und Radhakrishnan 2005** GARTEL, AL. ; RADHAKRISHNAN, SK.: Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. In: *Cancer research* 65 (2005), May 15, Nr. 10, S. 3980–5
- Gartel und Tyner 1999** GARTEL, AL. ; TYNER, AL.: Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. In: *Experimental cell research* 246 (1999), Feb 1, Nr. 2, S. 280–9
- Ghosh u. a. 2000** GHOSH, JC. ; IZUMIDA, Y. ; SUZUKI, K. ; KODAMA, S. ; WATANABE, M.: Dose-dependent biphasic accumulation of TP53 protein in normal human embryo cells after X irradiation. In: *Radiation research* 153 (2000), Mar, Nr. 3, S. 305–11
- Gilley u. a. 2005** GILLEY, D. ; TANAKA, H. ; HERBERT, BS.: Telomere dysfunction in aging and cancer. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (2005), May, Nr. 5, S. 1000–13
- Gire und Wynford-Thomas 1998** GIRE, V. ; WYNFORD-THOMAS, D.: Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. In: *Molecular and cellular biology* 18 (1998), Mar, Nr. 3, S. 1611–21
- Goetz 1975** GOETZ, I.E.: Growth of human skin fibroblasts from punch biopsies. In: *Methods in cell science* 1 (1975), Nr. 1, S. 13–15
- Going u. a. 2002** GOING, JJ. ; STUART, RC. ; DOWNIE, M. ; FLETCHER-MONAGHAN, AJ. ; KEITH, WN.: 'Senescence-associated' beta-galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. In: *The journal of pathology* 196 (2002), Apr, Nr. 4, S. 394–400
- Goldstein 1990** GOLDSTEIN, S.: Replicative senescence: The human fibroblast comes of age. In: *Science* 249 (1990), Sep 7, Nr. 4973, S. 1129–33
- Goldstein u. a. 1969** GOLDSTEIN, S. ; LITTLEFIELD, JW. ; SOELDNER, JS.: Diabetes mellitus and aging: Diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 64 (1969), Sep, Nr. 1, S. 155–60
- Goncharova u. a. 1996** GONCHAROVA, EI. ; NADAS, A. ; ROSSMAN, TG.: Serum deprivation, but not inhibition of growth per se, induces a hypermutable state in Chinese hamster G12 cells. In: *Cancer research* 56 (1996), Feb 15, Nr. 4, S. 752–6
- Greenblatt u. a. 1994** GREENBLATT, MS. ; BENNETT, WP. ; HOLLSTEIN, M. ; HARRIS, CC.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. In: *Cancer research* 54 (1994), Sep 15, Nr. 18, S. 4855–78

- Greider 1994** GREIDER, CW.: Mammalian telomere dynamics: Healing, fragmentation shortening and stabilization. In: *Current opinion in genetics & development* 4 (1994), Apr, Nr. 2, S. 203–11
- Greider 1998** GREIDER, CW.: Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 95 (1998), Jan 6, Nr. 1, S. 90–2
- Haberer u. a. 1993** HABERER, Th ; BECHER, W ; SCHARDT, D ; KRAFT, G: Magnetic scanning system for heavy ion therapy. In: *Nuclear instruments and methods* 330 (1993), S. 296–305
- Haberer u. a. 2004** HABERER, T. ; DEBUS, J. ; EICKHOFF, H. ; JÄKEL, O. ; SCHULZ-ERTNER, D. ; WEBER, U.: The Heidelberg Ion Therapy Center. In: *Radiotherapy and oncology* (2004), Dec, S. S186–90
- Hakenjos u. a. 2000** HAKENJOS, L. ; BAMBERG, M. ; RODEMANN, HP.: TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. In: *International journal of radiation biology* 76 (2000), Apr, Nr. 4, S. 503–9
- Hara u. a. 1996** HARA, E. ; SMITH, R. ; PARRY, D. ; TAHARA, H. ; STONE, S. ; PETERS, G.: Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. In: *Molecular and cellular biology* 16 (1996), Mar, Nr. 3, S. 859–67
- Harley u. a. 1990** HARLEY, CB. ; FUTCHER, AB. ; GREIDER, CW.: Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. In: *Nature* 345 (1990), May 31, Nr. 6274, S. 458–60
- Harper u. a. 1993** HARPER, JW. ; ADAMI, GR. ; WEI, N. ; KEYOMARSI, K. ; ELLEDGE, SJ.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. In: *Cell* 75 (1993), Nov 19, Nr. 4, S. 805–16
- Hayflick und Moorhead 1961** HAYFLICK, L. ; MOORHEAD, PS.: The serial cultivation of human diploid cell strains. In: *Experimental cell research* 25 (1961), Dec, S. 585–621
- Hengst u. a. 1998** HENGST, L. ; GOPPERT, U. ; LASHUEL, HA. ; REED, SI.: Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). In: *Genes & development* 12 (1998), Dec 15, Nr. 24, S. 3882–8
- Herbig u. a. 2004** HERBIG, U. ; JOBLING, WA. ; CHEN, BP. ; CHEN, DJ. ; SEDIVY, JM.: Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16(INK4a). In: *Molecular cell* 14 (2004), May 21, Nr. 4, S. 501–13
- Herbig und Sedivy 2006** HERBIG, U. ; SEDIVY, JM.: Regulation of growth arrest in senescence: Telomere damage is not the end of the story. In: *Mechanisms of ageing and development* 127 (2006), Jan, Nr. 1, S. 16–24
- Herskind und Rodemann 2000** HERSKIND, C. ; RODEMANN, HP.: Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. In: *Experimental gerontology* 35 (2000), Sep, Nr. 6–7, S. 747–55
- Hirayama u. a. 2005** HIRAYAMA, R. ; FURUSAWA, Y. ; FUKAWA, T. ; ANDO, K.: Repair kinetics of DNA-DSB induced by X-rays or carbon ions under oxic and hypoxic conditions. In: *Journal of radiation research* 46 (2005), Sep, Nr. 3, S. 325–32
- Hoglund und Stenerlow 2001** HOGLUND, H. ; STENERLOW, B.: Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in normal human skin fibroblasts after exposure to radiation of different linear energy transfer: Possible roles of track structure and chromatin organization. In: *Radiation research* 155 (2001), Jun, Nr. 6, S. 818–25

- Huffman u. a. 2000** HUFFMAN, KE. ; LEVENE, SD. ; TESMER, VM. ; SHAY, JW. ; WRIGHT, WE.: Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. In: *The journal of biological chemistry* 275 (2000), Jun 30, Nr. 26, S. 19719–22
- Iglesias u. a. 1999** IGLESIAS, J. ; ABERNETHY, VE. ; WANG, Z. ; LIEBERTHAL, W. ; KOH, JS. ; LEVINE, JS.: Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. In: *The American journal of physiology* 277 (1999), Nov, S. F711–22
- Itahana u. a. 2003** ITAHANA, K. ; ZOU, Y. ; ITAHANA, Y. ; MARTINEZ, JL. ; BEAUSEJOUR, C. ; JACOBS, JJ. ; VAN LOHUIZEN, M. ; BAND, V. ; CAMPISI, J. ; DIMRI, GP.: Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. In: *Molecular and cellular biology* 23 (2003), Jan, Nr. 1, S. 389–401
- Jeffrey u. a. 2000** JEFFREY, PD. ; TONG, L. ; PAVLETICH, NP.: Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. In: *Genes & development* 14 (2000), Dec 15, Nr. 24, S. 3115–25
- Kadhim und Wright 1998** KADHIM, MA. ; WRIGHT, EG.: Radiation-induced transmissible chromosomal instability in haemopoietic stem cells. In: *Advances in space research* 22 (1998), Nr. 4, S. 587–96
- Kessis u. a. 1993** KESSIS, TD. ; SLEBOS, RJ. ; NELSON, WG. ; KASTAN, MB. ; PLUNKETT, BS. ; HAN, SM. ; LORINCZ, AT. ; HEDRICK, L. ; CHO, KR.: Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 90 (1993), May 1, Nr. 9, S. 3988–92
- Kim u. a. 2006** KIM, GJ. ; CHANDRASEKARAN, K. ; MORGAN, WF.: Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: A review. In: *Mutagenesis* 21 (2006), Nov, Nr. 6, S. 361–7
- Kim und Sharpless 2006** KIM, WY. ; SHARPLESS, NE.: The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. In: *Cell* 127 (2006), Oct 20, Nr. 2, S. 265–75
- Kops u. a. 2005** KOPS, GJ. ; WEAVER, BA. ; CLEVELAND, DW.: On the road to cancer: Aneuploidy and the mitotic checkpoint. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (2005), Oct, Nr. 10, S. 773–85
- Kraft 1990** KRAFT, G.: The radiobiological and physical basis for radiotherapy with protons and heavier ions. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 166 (1990), Jan, Nr. 1, S. 10–3
- Kraft u. a. 1980** KRAFT, G. ; DAUES, H.W. ; FISCHER, B. ; KOPF, U. ; LIEBOLD, H.P. ; QUIS, D. ; STELZER, H. ; KIEFER, J. ; SCHPFER, F. ; SCHNEIDER, E. ; WEBER, K. ; WULF, H. ; DERTINGER, H.: Irradiation chamber and sample changer for biological samples. In: *Nuclear instruments and methods* 168 (1980), Nr. 1-3, S. 175–9
- Kraft u. a. 1999** KRAFT, G. ; SCHOLZ, M. ; BECHTHOLD, U.: Tumor Therapy and Track Structure. In: *Radiation and environmental biophysics* 38 (1999), S. 229–37
- Krishna u. a. 1999** KRISHNA, DR. ; SPERKER, B. ; FRITZ, P. ; KLOTZ, U.: Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? In: *Mechanisms of ageing and development* 109 (1999), Aug 30, Nr. 2, S. 113–23

- Krtolica u. a. 2001** KRTOLICA, A. ; PARRINELLO, S. ; LOCKETT, S. ; DESPREZ, PY. ; CAMPISI, J.: Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 98 (2001), Oct 9, Nr. 21, S. 12072–7
- Krtolica und Campisi 2002** KRTOLICA, A. ; CAMPISI, J.: Cancer and aging: A model for the cancer promoting effects of the aging stroma. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1401–14
- Krämer und Kraft 1994** KRÄMER, M. ; KRAFT, G.: Track structure and DNA damage. In: *Advances in space research* 14 (1994), Oct, Nr. 10, S. 151–9
- Krämer und Scholz 2000** KRÄMER, M. ; SCHOLZ, M.: Treatment planning for heavy-ion radiotherapy: Calculation and optimization of biologically effective dose. In: *Physics in medicine and biology* 45 (2000), Nov, Nr. 11, S. 3319–30
- Kurz u. a. 2000** KURZ, DJ. ; DECARY, S. ; HONG, Y. ; ERUSALIMSKY, JD.: Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. In: *Journal of cell science* 113 (2000), Oct, Nr. 20, S. 3613–22
- LaBaer u. a. 1997** LABAER, J. ; GARRETT, MD. ; STEVENSON, LF. ; SLINGERLAND, JM. ; SANDHU, C. ; CHOU, HS. ; FATTAEY, A. ; HARLOW, E.: New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. In: *Genes & development* 11 (1997), Apr 1, Nr. 7, S. 847–62
- Lakin und Jackson 1999** LAKIN, ND. ; JACKSON, SP.: Regulation of p53 in response to DNA damage. In: *Oncogene* 18 (1999), Dec 13, Nr. 53, S. 7644–55
- Lange u. a. 2004** LANGE, S. ; VIERGUTZ, T. ; SIMKO, M.: Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation. In: *Cell proliferation* 37 (2004), Oct, Nr. 5, S. 337–49
- Lara u. a. 1996** LARA, PC. ; RUSSELL, NS. ; SMOLDERS, IJ. ; BARTELINK, H. ; BEGG, AC. ; COCO-MARTIN, JM.: Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. In: *International journal of radiation biology* 70 (1996), Dec, Nr. 6, S. 683–92
- Laublin u. a. 1979** LAUBLIN, G. ; DESCHAVANNE, PJ. ; MALAISE, EP.: Effect of ionizing radiations on the life span of non-transformed human fibroblasts. In: *International journal of radiation biology and related studies in physics* 36 (1979), Sep, Nr. 3, S. 281–8
- Lee u. a. 1999** LEE, AC. ; FENSTER, BE. ; ITO, H. ; TAKEDA, K. ; BAE, NS. ; HIRAI, T. ; YU, ZX. ; FERRANS, VJ. ; HOWARD, BH. ; FINKEL, T.: Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. In: *The journal of biological chemistry* 274 (1999), Mar 19, Nr. 12, S. 7936–40
- Lee u. a. 2006** LEE, BY. ; HAN, JA. ; IM, JS. ; MORRONE, A. ; JOHUNG, K. ; GOODWIN, EC. ; KLEIJER, WJ. ; DIMAIO, D. ; HWANG, ES.: Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. In: *Aging cell* 5 (2006), Apr, Nr. 2, S. 187–95
- Leist u. a. 1996** LEIST, M. ; RAAB, B. ; MAURER, S. ; ROSICK, U. ; BRIGELIUS-FLOHE, R.: Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. In: *Free radical biology & medicine* 21 (1996), Nr. 3, S. 297–306

- Lengauer u. a. 1998** LENGAUER, C. ; KINZLER, KW. ; VOGELSTEIN, B.: Genetic instabilities in human cancers. In: *Nature* 396 (1998), Dec 17, Nr. 6712, S. 643–9
- Levine u. a. 1991** LEVINE, AJ. ; MOMAND, J. ; FINLAY, CA.: The p53 tumour suppressor gene. In: *Nature* 351 (1991), Jun 6, Nr. 6326, S. 453–6
- Liang u. a. 1998** LIANG, F. ; HAN, M. ; ROMANIENKO, PJ. ; JASIN, M.: Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 95 (1998), Apr 28, Nr. 9, S. 5172–7
- Lin u. a. 1998** LIN, AW. ; BARRADAS, M. ; STONE, JC. ; AELST, L. van ; SERRANO, M. ; LOWE, SW.: Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. In: *Genes & development* 12 (1998), Oct 1, Nr. 19, S. 3008–19
- Linke u. a. 1997** LINKE, SP. ; CLARKIN, KC. ; WAHL, GM.: p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. In: *Cancer research* 57 (1997), Mar 15, Nr. 6, S. 1171–9
- Lloyd 2002** LLOYD, AC.: Limits to lifespan. In: *Nature cell biology* 4 (2002), Feb, Nr. 2, S. E25–7
- Lukas u. a. 2004** LUKAS, J. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J.: Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time. In: *DNA repair* 3 (2004), Aug-Sep, Nr. 8–9, S. 997–1007
- Lukas und Bartek 2004** LUKAS, J. ; BARTEK, J.: Cell division: The heart of the cycle. In: *Nature* 432 (2004), Dec 2, Nr. 7017, S. 564–7
- Mareel und Leroy 2003** MAREEL, M. ; LEROY, A.: Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. In: *Physiological reviews* 83 (2003), Apr, Nr. 2, S. 337–76
- Masszi u. a. 2004** MASSZI, A. ; FAN, L. ; ROSIVALL, L. ; MCCULLOCH, CA. ; ROTSTEIN, OD. ; MUCSI, I. ; KAPUS, A.: Integrity of cell-cell contacts is a critical regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition: Role for beta-catenin. In: *The american journal of pathology* 165 (2004), Dec, Nr. 6, S. 1955–67
- Masur u. a. 1996** MASUR, SK. ; DEWAL, HS. ; DINH, TT. ; ERENBURG, I. ; PETRIDOU, S.: Myo-fibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 93 (1996), Apr 30, Nr. 9, S. 4219–23
- McClintock 1941** MCCLINTOCK, B.: The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. In: *Genetics* 26 (1941), S. 234–282
- McKenzie u. a. 1997** MCKENZIE, KE. ; SIVA, A. ; MAIER, S. ; RUNNEBAUM, IB. ; SESHADRI, R. ; SUKUMAR, S.: Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations. In: *Clinical cancer research* 3 (1997), Sep, Nr. 9, S. 1669–73
- Meng u. a. 2003** MENG, A. ; WANG, Y. ; VAN ZANT, G. ; ZHOU, D.: Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. In: *Cancer research* 63 (2003), Sep 1, Nr. 17, S. 5414–9
- Mitsui und Schneider 1976a** MITSUI, Y. ; SCHNEIDER, EL.: Relationship between cell replication and volume in senescent human diploid fibroblasts. In: *Mechanisms of ageing and development* 5 (1976), Jan-Feb, Nr. 1, S. 45–56

- Mitsui und Schneider 1976b** MITSUI, Y. ; SCHNEIDER, EL.: Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. In: *Experimental cell research* 100 (1976), Jun, Nr. 1, S. 147–52
- Morgan u. a. 1996** MORGAN, WF. ; DAY, JP. ; KAPLAN, MI. ; MCGHEE, EM. ; LIMOLI, CL.: Genomic instability induced by ionizing radiation. In: *Radiation research* 146 (1996), Sep, Nr. 3, S. 247–58
- Mothersill und Seymour 2003** MOTHERSILL, C. ; SEYMOUR, C.: Radiation-induced bystander effects, carcinogenesis and models. In: *Oncogene* 22 (2003), Oct 13, Nr. 45, S. 7028–33
- Moynahan und Jasin 1997** MOYNAHAN, ME. ; JASIN, M.: Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 94 (1997), Aug 19, Nr. 17, S. 8988–93
- Munro 1970** MUNRO, TR.: The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. In: *Radiation research* 42 (1970), Jun, Nr. 3, S. 451–70
- Murakami u. a. 1992** MURAKAMI, K. ; MUTO, N. ; FUKAZAWA, K. ; YAMAMOTO, I.: Comparison of ascorbic acid and ascorbic acid 2-O- α -glucoside on the cytotoxicity and bioavailability to low density cultures of fibroblasts. In: *Biochemical pharmacology* 44 (1992), Dec 1, Nr. 11, S. 2191–7
- Nakamura 2004** NAKAMURA, Y.: Isolation of p53-target genes and their functional analysis. In: *Cancer science* 95 (2004), Jan, Nr. 1, S. 7–11
- Nasmyth 1996** NASMYTH, K.: Viewpoint: Putting the cell cycle in order. In: *Science* 274 (1996), Dec 6, Nr. 5293, S. 1643–5
- Nasonova 2006** NASONOVA, E.: *Giemsa analysis of chromosomal aberrations in carbon and X-ray irradiated samples from experiment 8/04*. 2006. – Unveröffentlichte Ergebnisse
- Nasonova u. a. 2004** NASONOVA, E. ; FUSSEL, K. ; BERGER, S. ; GUDOWSKA-NOWAK, E. ; RITTER, S.: Cell cycle arrest and aberration yield in normal human fibroblasts. I. Effects of X-rays and 195 MeV u(-1) C ions. In: *International journal of radiation biology* 80 (2004), Sep, Nr. 9, S. 621–34
- Natarajan u. a. 1996** NATARAJAN, AT. ; BALAJEE, AS. ; BOEI, JJ. ; DARROUDI, F. ; DOMINGUEZ, I. ; HANDE, MP. ; MEIJERS, M. ; SLIJEPCEVIC, P. ; VERMEULEN, S. ; XIAO, Y.: Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence in situ hybridization. In: *Mutation research* 372 (1996), Dec, Nr. 2, S. 247–58
- Neidle und Parkinson 2003** NEIDLE, S. ; PARKINSON, GN.: The structure of telomeric DNA. In: *Current opinion in structural biology* 13 (2003), Jun, Nr. 3, S. 275–83
- Obe u. a. 2002** OBE, G. ; PFEIFFER, P. ; SAVAGE, JR. ; JOHANNES, C. ; GOEDECKE, W. ; JEPPESEN, P. ; NATARAJAN, AT. ; MARTINEZ-LOPEZ, W. ; FOLLE, GA. ; DRETS, ME.: Chromosomal aberrations: Formation, identification and distribution. In: *Mutation research* 504 (2002), Jul 25, Nr. 1–2, S. 17–36
- Olive 1998** OLIVE, PL.: The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. In: *Radiation research* 150 (1998), Nov, S. S42–51
- Olovnikov 1973** OLOVNIKOV, AM.: A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. In: *Journal of theoretical biology* 41 (1973), Sep 14, Nr. 1, S. 181–90

- Palmero u. a. 1997** PALMERO, I. ; MCCONNELL, B. ; PARRY, D. ; BROOKES, S. ; HARA, E. ; BATES, S. ; JAT, P. ; PETERS, G.: Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. In: *Oncogene* 15 (1997), Jul 31, Nr. 5, S. 495–503
- Parrinello u. a. 2005** PARRINELLO, S. ; COPPE, JP. ; KRTOLICA, A. ; CAMPISI, J.: Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. In: *Journal of cell science* 118 (2005), Feb 1, S. 485–96
- Pastwa u. a. 2003** PASTWA, E. ; NEUMANN, RD. ; MEZHEVAYA, K. ; WINTERS, TA.: Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. In: *Radiation research* 159 (2003), Feb, Nr. 2, S. 251–61
- Patino-Garcia u. a. 1998** PATINO-GARCIA, A. ; SOTILLO-PINEIRO, E. ; SIERRASESUMAGA-ARIZNABARRETA, L.: p21WAF1 mutation is not a predominant alteration in pediatric bone tumors. In: *Pediatric research* 43 (1998), Mar, Nr. 3, S. 393–5
- Pavey u. a. 1999** PAVEY, S. ; CONROY, S. ; RUSSELL, T. ; GABRIELLI, B.: Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. In: *Cancer research* 59 (1999), Sep 1, Nr. 17, S. 4185–9
- Pavletich 1999** PAVLETICH, NP.: Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. In: *Journal of molecular biology* 287 (1999), Apr 16, Nr. 5, S. 821–8
- Petridou u. a. 2000** PETRIDOU, S. ; MALTSEVA, O. ; SPANAKIS, S. ; MASUR, SK.: TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (2000), Jan, Nr. 1, S. 89–95
- Pinto u. a. 2005** PINTO, M. ; PRISE, KM. ; MICHAEL, BD.: Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics. In: *Radiation research* 164 (2005), Jul, Nr. 1, S. 73–85
- Pipiras u. a. 1998** PIPIRAS, E. ; COQUELLE, A. ; BIETH, A. ; DEBATISSE, M.: Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. In: *The EMBO journal* 17 (1998), Jan 2, Nr. 1, S. 325–33
- Plug-DeMaggio u. a. 2004** PLUG-DEMAGGIO, AW. ; SUNDSVOLD, T. ; WURSCHE, MA. ; KOOP, JL. ; KLINGELHUTZ, AJ. ; MCDUGALL, JK.: Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6. In: *Oncogene* 23 (2004), Apr 29, Nr. 20, S. 3561–71
- Plug-Demaggio und McDougall 2002** PLUG-DEMAGGIO, AW. ; MCDUGALL, JK.: The human papillomavirus type 16 E6 oncogene induces premature mitotic chromosome segregation. In: *Oncogene* 21 (2002), Oct 24, Nr. 49, S. 7507–13
- Pomerantz u. a. 1998** POMERANTZ, J. ; SCHREIBER-AGUS, N. ; LIEGEOIS, NJ. ; SILVERMAN, A. ; ALLAND, L. ; CHIN, L. ; POTES, J. ; CHEN, K. ; ORLOW, I. ; LEE, HW. ; CORDON-CARDO, C. ; DEPINHO, RA.: The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. In: *Cell* 92 (1998), Mar 20, Nr. 6, S. 713–23
- Prise u. a. 1998** PRISE, KM. ; AHNSTROM, G. ; BELLI, M. ; CARLSSON, J. ; FRANKENBERG, D. ; KIEFER, J. ; LOBRICH, M. ; MICHAEL, BD. ; NYGREN, J. ; SIMONE, G. ; STENERLOW, B.: A review of dsb induction data for varying quality radiations. In: *International journal of radiation biology* 74 (1998), Aug, Nr. 2, S. 173–84

- Prise u. a. 2001** PRISE, KM. ; PINTO, M. ; NEWMAN, HC. ; MICHAEL, BD.: A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. In: *Radiation research* 156 (2001), Nov, Nr. 5, S. 572–6
- Quelle u. a. 1995** QUELLE, DE. ; ZINDY, F. ; ASHMUN, RA. ; SHERR, CJ.: Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. In: *Cell* 83 (1995), Dec 15, Nr. 6, S. 993–1000
- Raju u. a. 1978a** RAJU, MR. ; AMOLS, HI. ; BAIN, E. ; CARPENTER, SG. ; COX, RA. ; ROBERTSON, JB.: A heavy particle comparative study. Part III: OER and RBE. In: *The british journal of radiology* 51 (1978), Sep, Nr. 609, S. 712–9
- Raju u. a. 1978b** RAJU, MR. ; AMOLS, HI. ; DICELLO, JF. ; HOWARD, J. ; LYMAN, JT. ; KOEHLER, AM. ; GRAVES, R. ; SMATHERS, JB.: A heavy particle comparative study. Part I: Depth-dose distributions. In: *The british journal of radiology* 51 (1978), Sep, Nr. 609, S. 699–703
- Raju u. a. 1978c** RAJU, MR. ; BAIN, E. ; CARPENTER, SG. ; COX, RA. ; ROBERTSON, JB.: A heavy particle comparative study. Part II: Cell survival versus depth. In: *The british journal of radiology* 51 (1978), Sep, Nr. 609, S. 704–11
- Raju und Carpenter 1978** RAJU, MR. ; CARPENTER, SG.: A heavy particle comparative study. Part IV: Acute and late reactions. In: *The british journal of radiology* 51 (1978), Sep, Nr. 609, S. 720–7
- Ramirez u. a. 2001** RAMIREZ, RD. ; MORALES, CP. ; HERBERT, BS. ; ROHDE, JM. ; PASSONS, C. ; SHAY, JW. ; WRIGHT, WE.: Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. In: *Genes & development* 15 (2001), Feb 15, Nr. 4, S. 398–403
- Rave-Frank u. a. 2001** RAVE-FRANK, M. ; VIRSIK-KOPP, P. ; PRADIER, O. ; NITSCHKE, M. ; GRUNEFELD, S. ; SCHMIDBERGER, H.: In vitro response of human dermal fibroblasts to X-irradiation: relationship between radiation-induced clonogenic cell death, chromosome aberrations and markers of proliferative senescence or differentiation. In: *International journal of radiation biology* 77 (2001), Dec, Nr. 12, S. 1163–74
- Reaper u. a. 2004** REAPER, PM. ; FAGAGNA, F. di ; JACKSON, SP.: Activation of the DNA damage response by telomere attrition: A passage to cellular senescence. In: *Cell cycle* 3 (2004), May, Nr. 5, S. 543–6
- Richardson und Jasin 2000** RICHARDSON, C. ; JASIN, M.: Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. In: *Nature* 405 (2000), Jun 8, Nr. 6787, S. 697–700
- Robles und Adami 1998** ROBLES, SJ. ; ADAMI, GR.: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. In: *Oncogene* 16 (1998), Mar 5, Nr. 9, S. 1113–23
- Rodemann 1993** RODEMANN, HP: *Cell and tissue culture models in dermatological research*. Kap. Differential Gene Expression, Protein Synthesis, and Degradation in Aging Fibroblasts, S. 320, Springer Verlag Heidelberg, 1993
- Rodemann u. a. 1989** RODEMANN, HP. ; BAYREUTHER, K. ; FRANZ, PI. ; DITTMANN, K. ; ALBIEZ, M.: Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. In: *Experimental cell research* 180 (1989), Jan, Nr. 1, S. 84–93

- Rodemann u. a. 1991** RODEMANN, HP. ; PETERSON, HP. ; SCHWENKE, K. ; WANGENHEIM, KH. von: Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. In: *Scanning microscopy* 5 (1991), Dec, Nr. 4, S. 1135–42; discussion 1142–3
- Rodemann und Bamberg 1995** RODEMANN, HP. ; BAMBERG, M.: Cellular basis of radiation-induced fibrosis. In: *Radiotherapy and oncology* 35 (1995), May, Nr. 2, S. 83–90
- Rodier u. a. 2005** RODIER, F. ; KIM, SH. ; NIJJAR, T. ; YASWEN, P. ; CAMPISI, J.: Cancer and aging: The importance of telomeres in genome maintenance. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37 (2005), May, Nr. 5, S. 977–90
- Roninson 2002** RONINSON, IB.: Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. In: *Cancer letters* 179 (2002), May 8, Nr. 1, S. 1–14
- Rosenblat u. a. 1998** ROSENBLAT, G. ; PERELMAN, N. ; KATZIR, E. ; GAL-OR, S. ; JONAS, A. ; NIMNI, ME. ; SORGENTE, N. ; NEEMAN, I.: Acylated ascorbate stimulates collagen synthesis in cultured human foreskin fibroblasts at lower doses than does ascorbic acid. In: *Connective tissue research* 37 (1998), Nr. 3–4, S. 303–11
- Rossi 1998** ROSSI, HH.: ICRU Report 60 - Fundamental quantities and units for ionizing radiation / International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). 1998 (60). – Report
- Rubin 2002** RUBIN, H.: The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. In: *Nature biotechnology* 20 (2002), Jul, Nr. 7, S. 675–81
- Ruehl u. a. 2005** RUEHL, M. ; ERBEN, U. ; SCHUPPAN, D. ; WAGNER, C. ; ZELLER, A. ; FREISE, C. ; AL-HASANI, H. ; LOESEKANN, M. ; NOTTER, M. ; WITTIG, BM. ; ZEITZ, M. ; DIETERICH, W. ; SOMASUNDARAM, R.: The elongated first fibronectin type III domain of collagen XIV is an inducer of quiescence and differentiation in fibroblasts and preadipocytes. In: *The journal of biological chemistry* 280 (2005), Nov 18, Nr. 46, S. 38537–43
- Saito u. a. 2003** SAITO, A. ; OKAZAKI, H. ; SUGAWARA, I. ; YAMAMOTO, K. ; TAKIZAWA, H.: Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. In: *International archives of allergy and immunology* 132 (2003), Oct, Nr. 2, S. 168–76
- Sancar u. a. 2004** SANCAR, A. ; LINDSEY-BOLTZ, LA. ; UNSAL-KACMAZ, K. ; LINN, S.: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. In: *Annual review of biochemistry* 73 (2004), S. 39–85
- Saran 2004** SARAN, F.: New technology for radiotherapy in paediatric oncology. In: *European journal of cancer* 40 (2004), Sep, Nr. 14, S. 2091–105
- Sarsour u. a. 2005** SARSOOR, EH. ; AGARWAL, M. ; PANDITA, TK. ; OBERLEY, LW. ; GOSWAMI, PC.: Manganese superoxide dismutase protects the proliferative capacity of confluent normal human fibroblasts. In: *The journal of biological chemistry* 280 (2005), May 6, Nr. 18, S. 18033–41
- Scholz 2003** SCHOLZ, M.: Effects of ion radiation on cells and tissues. In: *Advances in polymer science* 162 (2003), S. 97–155
- Scholz u. a. 1997** SCHOLZ, M. ; KELLERER, AM. ; KRAFT-WEYRATHER, W. ; KRAFT, G.: Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. The model and its approximation. In: *Radiation and environmental biophysics* 36 (1997), Feb, Nr. 1, S. 59–66

- Schulz-Ertner u. a. 2004a** SCHULZ-ERTNER, D. ; NIKOGHOSYAN, A. ; DIDINGER, B. ; DEBUS, J.: Carbon ion radiation therapy for chordomas and low grade chondrosarcomas – Current status of the clinical trials at GSI. In: *Radiotherapy and oncology* (2004), Dec, S. S53–6
- Schulz-Ertner u. a. 2004b** SCHULZ-ERTNER, D. ; NIKOGHOSYAN, A. ; THILMANN, C. ; HABERER, T. ; JÄKEL, O. ; KARGER, C. ; KRAFT, G. ; WANNENMACHER, M. ; DEBUS, J.: Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58 (2004), Feb 1, Nr. 2, S. 631–40
- Schulz-Ertner u. a. 2007** SCHULZ-ERTNER, D. ; NIKOGHOSYAN, A. ; HOF, H. ; DIDINGER, B. ; COMBS, SE. ; JÄKEL, O. ; KARGER, CP. ; EDLER, L. ; DEBUS, J.: Carbon ion radiotherapy of skull base chondrosarcomas. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 67 (2007), Jan 1, Nr. 1, S. 171–7
- Schäfer 1998** SCHÄFER, KA.: The cell cycle: A review. In: *Veterinary pathology* 35 (1998), Nov, Nr. 6, S. 461–78
- Sen 2000** SEN, S.: Aneuploidy and cancer. In: *Current opinion in oncology* 12 (2000), Jan, Nr. 1, S. 82–8
- Serini u. a. 1998** SERINI, G. ; BOCHATON-PIALLAT, ML. ; ROPRAZ, P. ; GEINOZ, A. ; BORSI, L. ; ZARDI, L. ; GABBIANI, G.: The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. In: *The journal of cell biology* 142 (1998), Aug 10, Nr. 3, S. 873–81
- Serra u. a. 2003** SERRA, V. ; ZGLINICKI, T. von ; LORENZ, M. ; SARETZKI, G.: Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. In: *The journal of biological chemistry* 278 (2003), Feb 28, Nr. 9, S. 6824–30
- Serrano 1997** SERRANO, M.: The tumor suppressor protein p16INK4a. In: *Experimental cell research* 237 (1997), Nov 25, Nr. 1, S. 7–13
- Serrano u. a. 1993** SERRANO, M. ; HANNON, GJ. ; BEACH, D.: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. In: *Nature* 366 (1993), Dec 16, Nr. 6456, S. 704–7
- Serrano und Blasco 2001** SERRANO, M. ; BLASCO, MA.: Putting the stress on senescence. In: *Current opinion in cell biology* 13 (2001), Dec, Nr. 6, S. 748–53
- Severino u. a. 2000** SEVERINO, J. ; ALLEN, RG. ; BALIN, S. ; BALIN, A. ; CRISTOFALO, VJ.: Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? In: *Experimental cell research* 257 (2000), May 25, Nr. 1, S. 162–71
- Shay und Wright 2005** SHAY, JW. ; WRIGHT, WE.: Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. In: *Carcinogenesis* 26 (2005), May, Nr. 5, S. 867–74
- Sherr und Roberts 1999** SHERR, CJ. ; ROBERTS, JM.: CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. In: *Genes & development* 13 (1999), Jun 15, Nr. 12, S. 1501–12
- Sherwood u. a. 1988** SHERWOOD, SW. ; RUSH, D. ; ELLSWORTH, JL. ; SCHIMKE, RT.: Defining cellular senescence in IMR-90 cells: A flow cytometric analysis. In: *Proceedings of the national academy of sciences* 85 (1988), Dec, Nr. 23, S. 9086–90

- Shieh u. a. 1997** SHIEH, SY. ; IKEDA, M. ; TAYA, Y. ; PRIVES, C.: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. In: *Cell* 91 (1997), Oct 31, Nr. 3, S. 325–34
- Shin u. a. 2006** SHIN, JS. ; HONG, A. ; SOLOMON, MJ. ; LEE, CS.: The role of telomeres and telomerase in the pathology of human cancer and aging. In: *Pathology* 38 (2006), Apr, Nr. 2, S. 103–13
- Shiohara u. a. 1994** SHIOHARA, M. ; DEIRY, WS. el ; WADA, M. ; NAKAMAKI, T. ; TAKEUCHI, S. ; YANG, R. ; CHEN, DL. ; VOGELSTEIN, B. ; KOEFFLER, HP.: Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. In: *Blood* 84 (1994), Dec 1, Nr. 11, S. 3781–4
- Siliciano u. a. 1997** SILICIANO, JD. ; CANMAN, CE. ; TAYA, Y. ; SAKAGUCHI, K. ; APPELLA, E. ; KASTAN, MB.: DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. In: *Genes & development* 11 (1997), Dec 15, Nr. 24, S. 3471–81
- Simpson 1983** SIMPSON, JA: Elemental and isotopic composition of the galactic cosmic rays. In: *Annual review of nuclear and particle science* 33 (1983), S. 323
- Smith und Hayflick 1974** SMITH, JR. ; HAYFLICK, L.: Variation in the life-span of clones derived from human diploid cell strains. In: *The journal of cell biology* 62 (1974), Jul, Nr. 1, S. 48–53
- Sommer 2006** SOMMER, S.: *mFISH analysis of the progeny of fibroblasts irradiated with 16 Gy X-rays in experiment 8/04.* 2006. – Unveröffentlichte Ergebnisse
- Sonoda u. a. 2006** SONODA, E. ; HOCHEGGER, H. ; SABERI, A. ; TANIGUCHI, Y. ; TAKEDA, S.: Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. In: *DNA repair* 5 (2006), Sep 8, Nr. 9-10, S. 1021–9
- Stanchina u. a. 1998** STANCHINA, E. d. ; MCCURRACH, ME. ; ZINDY, F. ; SHIEH, SY. ; FERBEYRE, G. ; SAMUELSON, AV. ; PRIVES, C. ; ROUSSEL, MF. ; SHERR, CJ. ; LOWE, SW.: E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. In: *Genes & development* 12 (1998), Aug 1, Nr. 15, S. 2434–42
- Stein u. a. 1999** STEIN, GH. ; DRULLINGER, LF. ; SOULARD, A. ; DULIC, V.: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. In: *Molecular and cellular biology* 19 (1999), Mar, Nr. 3, S. 2109–17
- Stein und Dulic 1995** STEIN, GH. ; DULIC, V.: Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. In: *Bioessays* 17 (1995), Jun, Nr. 6, S. 537–43
- Suzuki u. a. 2001** SUZUKI, K. ; MORI, I. ; NAKAYAMA, Y. ; MIYAKODA, M. ; KODAMA, S. ; WATANABE, M.: Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. In: *Radiation research* 155 (2001), Jan, S. 248–253
- Suzuki u. a. 2003** SUZUKI, K. ; OJIMA, M. ; KODAMA, S. ; WATANABE, M.: Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. In: *Oncogene* 22 (2003), Oct 13, Nr. 45, S. 6988–93
- Takai u. a. 2003** TAKAI, H. ; SMOGORZEWSKA, A. ; LANGE, T. de: DNA damage foci at dysfunctional telomeres. In: *Current biology* 13 (2003), Sep 2, Nr. 17, S. 1549–56
- Taucher-Scholz u. a. 1996** TAUCHER-SCHOLZ, G. ; HEILMANN, J. ; KRAFT, G.: Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. In: *Advances in space research* 18 (1996), Nr. 1–2, S. 83–92

- Taylor 2003** TAYLOR, RE.: Proton radiotherapy for paediatric tumours: Potential areas for clinical research. In: *Clinical oncology* 15 (2003), Feb, Nr. 1, S. S32–6
- Tibbetts u. a. 1999** TIBBETTS, RS. ; BRUMBAUGH, KM. ; WILLIAMS, JM. ; SARKARIA, JN. ; CLIBY, WA. ; SHIEH, SY. ; TAYA, Y. ; PRIVES, C. ; ABRAHAM, RT.: A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. In: *Genes & development* 13 (1999), Jan 15, Nr. 2, S. 152–7
- Toussaint u. a. 2000** TOUSSAINT, O. ; MEDRANO, EE. ; ZGLINICKI, T. von: Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. In: *Experimental gerontology* 35 (2000), Oct, Nr. 8, S. 927–45
- Troen 2003** TROEN, BR.: The biology of aging. In: *The mount sinai journal of medicine* 70 (2003), Jan, Nr. 1, S. 3–22
- Tsang u. a. 1995** TSANG, NM. ; NAGASAWA, H. ; LI, C. ; LITTLE, JB.: Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene enhances the resistance of human diploid fibroblasts to ionizing radiation. In: *Oncogene* 10 (1995), Jun 15, Nr. 12, S. 2403–8
- Tsutsui u. a. 1997** TSUTSUI, T. ; TANAKA, Y. ; MATSUDO, Y. ; HASEGAWA, K. ; FUJINO, T. ; KODAMA, S. ; BARRETT, JC.: Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. In: *Molecular carcinogenesis* 18 (1997), Jan, Nr. 1, S. 7–18
- Tsuyama u. a. 2001** TSUYAMA, N. ; IDE, T. ; NODA, A. ; IWAMOTO, KS. ; MIZUNO, T. ; KYOIZUMI, S. ; SEYAMA, T.: X-rays induce dose-dependent and cell cycle-independent accumulation of p21(sdi1/WAF1). In: *Hiroshima journal of medical sciences* 50 (2001), Mar, Nr. 1, S. 1–7
- Vidal und Koff 2000** VIDAL, A. ; KOFF, A.: Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. In: *Gene* 247 (2000), Apr 18, Nr. 1–2, S. 1–15
- Von Zglinicki 2003** VON ZGLINICKI, T.: Replicative senescence and the art of counting. In: *Experimental gerontology* 38 (2003), Nov-Dec, Nr. 11–12, S. 1259–64
- Vracko u. a. 1983** VRACKO, R. ; MCFARLAND, BH. ; PECORARO, RE.: Seeding efficiency, plating efficiency, and population doublings of human skin fibroblastlike cells: Results of replicate testing. In: *In vitro* 19 (1983), Jun, Nr. 6, S. 504–14
- Walchli u. a. 1994** WALCHLI, C. ; KOCH, M. ; CHIQUET, M. ; ODERMATT, BF. ; TRUEB, B.: Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. In: *Journal of cell science* 107 Pt 2 (1994), Feb, S. 669–81
- Watanabe u. a. 1992** WATANABE, M. ; SUZUKI, M. ; SUZUKI, K. ; NAKANO, K. ; WATANABE, K.: Effect of multiple irradiation with low doses of gamma-rays on morphological transformation and growth ability of human embryo cells in vitro. In: *International journal of radiation biology* 62 (1992), Dec, Nr. 6, S. 711–8
- Watson 1972** WATSON, JD.: Origin of concatemeric T7 DNA. In: *Nature: New biology* 239 (1972), Oct 18, Nr. 94, S. 197–201
- Webley u. a. 2000** WEBLEY, K. ; BOND, JA. ; JONES, CJ. ; BLAYDES, JP. ; CRAIG, A. ; HUPP, T. ; WYNFORD-THOMAS, D.: Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. In: *Molecular and cellular biology* 20 (2000), Apr, Nr. 8, S. 2803–8

- Wei u. a. 2003** WEI, W. ; HERBIG, U. ; WEI, S. ; DUTRIAUX, A. ; SEDIVY, JM.: Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. In: *EMBO reports* 4 (2003), Nov, Nr. 11, S. 1061–6
- Wei und Sedivy 1999** WEI, W. ; SEDIVY, JM.: Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. In: *Experimental cell research* 253 (1999), Dec 15, Nr. 2, S. 519–22
- Weyrather und Debus 2003** WEYRATHER, WK. ; DEBUS, J.: Particle beams for cancer therapy. In: *Clinical oncology* 15 (2003), Feb, Nr. 1, S. S23–8
- Wilson u. a. 2005** WILSON, VC. ; McDONOUGH, J. ; TOCHNER, Z.: Proton beam irradiation in pediatric oncology: An overview. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 27 (2005), Aug, Nr. 8, S. 444–8
- Winter 2002** WINTER, M.: *Einfluss von Strahlung auf die Zellzyklus-Progression und die Ausprägung von Chromosomenschäden*, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit, 2002
- Wright und Shay 2002** WRIGHT, WE. ; SHAY, JW.: Historical claims and current interpretations of replicative aging. In: *Nature biotechnology* 20 (2002), Jul, Nr. 7, S. 682–8
- Yang u. a. 2005** YANG, H. ; ASAAD, N. ; HELD, KD.: Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. In: *Oncogene* 24 (2005), Mar 17, Nr. 12, S. 2096–103
- Yang und Hu 2005** YANG, NC. ; HU, ML.: The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. In: *Experimental gerontology* 40 (2005), Oct, Nr. 10, S. 813–9
- Yegorov u. a. 1998** YEGOROV, YE. ; AKIMOV, SS. ; HASS, R. ; ZELENIN, AV. ; PRUDOVSKY, IA.: Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. In: *Experimental cell research* 243 (1998), Aug 25, Nr. 1, S. 207–11
- Zahnreich 2006** ZAHNREICH, S.: *Spontane und strahleninduzierte Chromosomenschäden und genetische Instabilität in Langzeitkulturen verschiedener humaner Fibroblastenlinien*, Hochschule Darmstadt, Diplomarbeit, 2006
- Zahnreich und Ritter 2006** ZAHNREICH, S. ; RITTER, S.: *Long-term analysis of apoptosis in the progeny of X-ray irradiated fibroblasts*. 2006. – Unveröffentlichte Ergebnisse
- Zhu u. a. 1998** ZHU, J. ; WOODS, D. ; MCMAHON, M. ; BISHOP, JM.: Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. In: *Genes & development* 12 (1998), Oct 1, Nr. 19, S. 2997–3007

Lebenslauf

Persönliche Daten

Marcus Winter
Lauteschlägerstraße 1a
64289 Darmstadt

geboren am 6. April 1974 in Jugenheim

Schulbildung

08/1980–05/1984 Hans-Quick-Grundschule in Bickenbach

08/1984–05/1993 Altes Kurfürstliches Gymnasium in Bensheim; Abschluss: Abitur

Hochschulstudium

10/1993–9/1996 Physik an der Technischen Universität Darmstadt

10/1996–9/2002 Biologie an der Technischen Universität Darmstadt; Schwerpunkte: Zellbiologie, Biochemie und Zoologie; Titel der Diplomarbeit: „Einfluss von Strahlung auf die Zellzyklus-Progression und die Ausprägung von Chromosomenschäden“ (Professor Kraft); Abschluss: Diplom

Berufstätigkeit

seit 01/2003 Anfertigung einer Dissertation an der Gesellschaft für Schwerionenforschung, Darmstadt; Titel der Dissertation: „Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen“ (Professor Kraft)

Darmstadt, 9. Juni 2007

Erklärung gemäß § 9 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Allgemeinen Bestimmungen der Promotionsordnung der Technischen Universität Darmstadt vom 12. Januar 1990 in der Fassung der IV. Änderung vom 16. August 2001, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der
vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach
Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Kohlenstoff-Ionen**

selbständig verfasst und bei ihrer Anfertigung keine außer den ausdrücklich genannten Hilfsmitteln benutzt habe.

Darmstadt, 9. Juni 2007

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung Biophysik der Gesellschaft für Schwerionenforschung, unter der Leitung von Prof. Dr. G. Kraft in der Zeit von Januar 2003 bis Februar 2007 angefertigt. Den Abschluss dieser Arbeit möchte ich dazu nutzen, all denjenigen Menschen zu danken, die bei der Anfertigung dieser Arbeit involviert waren.

Prof. Dr. G. Kraft danke ich für die Überlassung der Fragestellungen, die Ausgangspunkt dieser Arbeit waren. Sein Interesse am Fortgang der Arbeit und sein Engagement für die Durchführung der Tumorthherapie mit schweren Ionen waren für mich eine große Motivation. Jenseits der fachlichen Aspekte war auch seine stete Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten eine wertvolle Hilfe.

Prof. Dr. P. G. Layer aus dem Fachbereich Zoologie der TU Darmstadt hat sich freundlicherweise als Mitberichterstatte zur Verfügung gestellt, dafür danke ich ihm.

Weiterhin danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung des Projekts „Genetische Wirkung dicht ionisierender Strahlung“ unter dem Förderkennzeichen 02S 8203, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand.

Dr. Claudia Fournier hat die Betreuung meiner Dissertation übernommen. Ihre dabei an den Tag gelegte professionelle Leidenschaft war für mich die größte Motivation. Ihr umfassender Überblick über die Materie half mir dabei, das Thema Arbeit im Auge zu behalten und die richtigen Fragen zu stellen. Ihre konstruktiven Vorschläge und Ideen erwiesen sich als unschätzbar wertvoll und haben die Qualität dieser Arbeit erhöht. Auf Grund ihrer Expertise auf dem Gebiet der Beurteilung der Zellmorphologie hat sie die Auswertung der Differenzierungsmuster übernommen. Für diese enorme Unterstützung verdient sie meinen größten Dank.

Petra Hessel habe ich es zu verdanken, dass ich in einem hervorragend geführten Labor arbeiten konnte. Die umfangreichen Experimente konnten nur mit ihrer praktischen Unterstützung in der geplanten Weise umgesetzt werden. Sie stand mir auch jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, sei es in fachlichen als auch in praktischen Belangen. Dafür danke ich ihr ganz besonders. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie eine sehr mühevollen Arbeit, nämlich die Auswertung der β -Galaktosidase-Proben, zum Großteil übernommen hat.

Dr. Sylvia Ritter danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Rahmen der „Chromosomengruppe“ durchzuführen. Dabei war ihre umfangreiche Erfahrung mit den organisatorischen Hürden wissenschaftlicher Arbeit und ihr breiter Blickwinkel auf die Materie eine große Hilfe.

PD Dr. Michael Scholz und Dr. Thilo Elsässer danke ich für die Organisation der Strahlzeiten und für die wertvollen und launigen Diskussionen zu den diversen physikalischen Aspekten dieser Arbeit.

Wolfgang Becher und Günter Lenz danke ich für den reibungslosen technischen Ablauf am Bestrahlungsplatz und den vielen anderen technischen Hilfsleistungen.

Durch die Mitarbeiter der Abteilung Biophysik erfuhr ich in den Jahren meiner dortigen Tätigkeit eine große Hilfsbereitschaft und viel Unterstützung. Dafür, und für die dort vorherrschende, ausgesprochen gute Atmosphäre danke ich diesem starken Team.

Mein Dank gilt auch der Gesellschaft für Schwerionenforschung und den vielen Mitarbeitern aus den verschiedenen Bereichen, die den Rahmen für ein effizientes wissenschaftliches Arbeiten geschaffen haben.

Zum Schluss möchte ich für die Unterstützung danken, die mir von meiner Familie zuteil wurde, ein Dank, der nur schwer in Worte zu fassen ist. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich besonders für ihre Förderung und ihren Beistand während meiner gesamten Ausbildung. Nicht zuletzt danke ich auch meiner Freundin, Lebensgefährtin und Partnerin Carmen, die auch in den schwierigen Phasen immer zu mir gestanden hat und während dieser Zeit so manche Entsagung geduldig ertragen hat. Ihnen allen ist diese Arbeit gewidmet.